

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**FUNGOS DE PRÉ E PÓS COLHEITA E A
QUALIDADE DE GRÃOS DE MILHO**

João Anaracy Santin
Químico Industrial

Tese apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Doutor em Fitotecnia,
área de concentração Fitossanidade

Porto Alegre (RS), Brasil
Dezembro, 2001

AGRADECIMENTOS

À milha família, Ocsana e Fabiano, pelo estímulo e apoio sempre dispensados.

À Profa. Dra. Aida Terezinha Santos Matsumura por sua orientação, incentivo e amizade.

Ao Prof. Erlei Melo Reis pela oportunidade de trabalharmos juntos, pela amizade, pelo estímulo e por sua orientação.

Ao Prof. Marcelo Gravina de Moraes por sua orientação e incentivo.

Aos colegas Cinara, Daniela, Delton, Helber, Michele, Paulo, Roberto e Tatiane pelo auxílio e pela dedicação na execução das análises.

À colega e Profa. Dileta Cecchetti pela amizade e inestimável auxílio nas análises estatísticas.

À amiga Simone Trento pelo inestimável auxílio no planejamento e execução de parte dos trabalhos experimentais.

À Cooperativa Tritícola Erechim Ltda. pelo incentivo e auxílio financeiro.

À empresa Cerealista Lodi Ltda. pelo incentivo, estímulo e auxílio financeiro.

À Marisa, secretária do PPG em Fitotecnia, pela prestatividade e dedicação .

À UPF e a UFRGS pelo incentivo e pela oportunidade.

FUNGOS DE PRÉ E PÓS COLHEITA E A QUALIDADE DE GRÃOS DE MILHO

Autor: João Anaracy Santin

Orientadora: Profa. Aida Terezinha Santos Matsumura

Co-orientador: Prof. Erlei Melo Reis

RESUMO

O papel do milho na alimentação humana e animal é importante por causa da composição química e do valor nutritivo; por isso, é um dos cereais mais cultivados e consumidos no mundo. Uma das principais causas de danos à qualidade dos grãos é a infecção fúngica e a conseqüente contaminação por micotoxinas. Neste trabalho, foi identificado os efeitos do retardamento da colheita, do grau de umidade e do período de armazenamento dos grãos na ocorrência de fungos patogênicos e de grãos ardidos e a possível contaminação por micotoxinas na lavoura e durante o armazenamento, com o objetivo de caracterizar a influência dos fungos de pré e pós colheita na qualidade dos grãos de milho nas safras 98/99 e 99/00. A incidência de fungos patogênicos foi quantificada em 400 grãos e de grãos ardidos (GA), a percentagem de grãos com injúria mecânica visível (IMV) e de grãos normais (GN) em quatro repetições de 250 g de grãos. A contaminação por micotoxinas foi analisada por cromatografia de camada delgada e as características nutricionais foram analisadas por espectrometria de reflectância no infravermelho proximal. O retardamento da colheita gerou condições favoráveis para a elevação da incidência dos fungos das espécies *Aspergillus* spp., *Cephalosporium* spp., *Fusarium graminearum* e *Penicillium* spp. A incidência de GA se elevou enquanto os grãos apresentavam umidade acima de 20%. A incidência de *Fusarium moniliforme* foi reduzindo à medida que os grãos perdiam água. O percentual de grãos com IMV somados a incidência GA foi de 15,90% no silo de Lodi e de 15,78% na Cotrel. O retardamento de colheita influenciou na ocorrência de fungos, de GA e de micotoxinas na lavoura. As práticas de manejo das lavouras e a operação de colheita afetaram qualidade comercial dos grãos de milho e o armazenamento conservou as características nutricionais.

^{1/}Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, (200 p.) Dezembro, 2001.

FUNGI OF PRE AND POST HARVEST AND THE QUALITY OF CORN GRAINS

João Anaracy Santin - Author
Adviser: Aida Terezinha Santos Matsumura
Co-adviser: Erlei Melo Reis

Abstract

The role of corn in human and animal feeding is important because it chemical composition and nutritional value; therefore, corn is one of the most grown and consumed cereals in the world. One of the principal causes of damages to the grains is fungal infection. In this work, it was aimed to characterize the influence of the humidity and of the cultural practices in the commercial and nutritious quality of the corn grains, in the field and in the storage, through the quantification of the incidence of pathogenic fungi and of damaged grains (DG), of the percentage of grains with visible mechanical damage (VMD) and of normal grains (NG) and of the contamination by mycotoxins, in the 98/99 and 99/00 season. The incidence of pathogenic fungi was determined in 400 incubated grains, in growth chamber with 25 ± 2 °C with photoperiod of 12 hours during seven days. The mycotoxins were analysed by the cromathography method of thin layer. The incidence of DG and the percentage of grains with VMD and NG was determined by the average of four repetitions of 250 g. The incidence of DG rose while the grains presented humidity above 20%. The incidence of *Fusarium moniliforme* was of 60,5% in the grains was humidity of 38% and it was reduced as the grains lost humidity, whereas it rose in the species of the genera *Aspergillus* and *Penicillium* and *Cephalosporium*. In the last sample of grains on the farm, sterigmatocystin, ochratoxin and zearalenone were detected. The percentage of grains with VMD added to the incidence of DG was of 15,90% in Lodi's silo and of 15,78% in Cotrel's. In the simuleted bulk storage and in corn ears, sterigmatocystin, ochratoxin and zearalenone were detected. The moisture content of grains and the delay of the corn harvest influenced of DG, of pathogenic fungi and in the contamination by mycotoxins. The harvest affected commercial quality of the grains.

^{1/} Doctoral thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil, (200p.) December, 2001.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1. Considerações gerais	6
2.2. Microrganismos envolvidos com podridões de espigas e micotoxinas...	9
2.2.1. Posição sistemática dos fungos	9
2.3. Gênero <i>Aspergillus</i>	10
2.3.1. Características morfológicas	10
2.3.2. Podridão de aspergilus	11
2.3.3. Ciclo biológico de <i>Aspergillus</i>	12
2.3.3.1. Sobrevivência.....	12
a) Fontes de inóculo.....	12
2.3.3.2. Disseminação.....	13
a) Sítios se infecção.....	13
2.3.3.3. Penetração	14
2.3.3.4. Colonização	14
2.3.3.5. Reprodução	15
2.3.4. Micotoxinas de <i>Aspergillus</i>	15
2.3.4.1. Aflatoxinas	15
2.3.4.1. Ocratoxinas	16
2.3.5. Aflatoxicoses e Ocratoxicoses	17
2.4. Gênero <i>Cephalosporium</i>	18
2.4.1. Características morfológicas	18
2.4.2. Podridão de cefalosporium.....	19
2.4.3. Ciclo biológico de <i>Cephalosporium</i>	19
2.4.3.1. Sobrevivência	19
a) Fontes de inóculo	19
2.4.3.2. Disseminação	20
a) Sítios se infecção.....	20
2.4.3.3. Penetração	21
2.4.3.4. Colonização	21
2.4.3.5. Reprodução	21
2.4.4. Micotoxinas de <i>Cephalosporium</i>	22
2.4.4.1. Tricotecenos	22
2.4.5. Toxicoses de tricotecenos	23
2.5. Gênero <i>Diplodia</i>	23
2.5.1. Características morfológicas	23
2.5.2. Podridão de diplodia.....	24
2.5.3. Ciclo biológico de <i>Diplodia</i>	24
2.5.3.1. Sobrevivência	24
a) Fontes de inóculo	25
2.5.3.2. Disseminação	25
a) Sítios se infecção	25
2.5.3.3. Penetração	25

2.5.3.4. Colonização	26
2.5.3.5. Reprodução	26
2.5.4. Micotoxinas de <i>Diplodia</i>	26
2.5.4.1. Diplodiotoxina	26
2.5.5. Diplodiose	27
2.6. Gênero <i>Fusarium</i>	27
2.6.1. Características morfológicas	28
2.6.2. Podridão de fusarium	29
2.6.2.1. Podridão-rosada da base da espiga	29
2.6.2.2. Podridão-rosada da ponta da espiga	30
2.6.3. Ciclos biológicos de <i>Fusarium</i>	30
2.6.3.1. Sobrevivência	30
a) Fontes de inóculo	31
2.6.3.2. Disseminação	31
a) Sítios se infecção	32
2.6.3.3. Penetração	32
2.6.3.4. Colonização	33
2.6.3.5. Reprodução	33
2.6.4. Micotoxinas de <i>Fusarium</i>	34
2.6.4.1. Fumonisinias	34
2.6.4.2. Tricotecenos: Deoxinivalenol, Nivalenol e Toxina T2	35
2.6.4.3. Zearalenona	35
2.6.5. Fusariotoxicoses	36
2.7. Gênero <i>Penicillium</i>	37
2.7.1. Características morfológicas	37
2.7.2. Podridão de penicilium	37
2.7.3. Ciclo biológico de <i>Penicillium</i>	38
2.7.3.1. Sobrevivência	38
a) Fontes de inóculo	38
2.7.3.2. Disseminação	39
a) Sítios se infecção.....	39
2.7.3.3. Penetração	39
2.7.3.4. Colonização	40
2.7.3.5. Reprodução	40
2.7.4. Micotoxinas de <i>Penicillium</i>	40
2.7.4.1. Ocratoxicoses	41
2.8. Medidas de Controle de doenças de milho	41
2.8.1. Princípios e métodos de controle de doenças	41
2.8.2. Controle genético	43
2.8.3. Escolha do híbrido	44
2.8.4. Rotação de culturas	45
2.8.5. População de plantas	46
2.8.6. Colheita	47
2.8.6.1. Regulagem da colhedora	48
2.9. Medidas de conservação pós-colheita	49
2.9.1. Secagem	49
2.9.2. Armazenamento	50
2.9.2.1. Grau de umidade dos grãos armazenados	52
2.9.2.2. Temperatura dos grãos armazenados	53

2.9.2.3. Aeração dos grãos armazenados	54
2.10. Danos e Perdas	55
2.10.1. Danos por microrganismos	55
2.10.2. Danos na colheita	57
3 EFEITO DO RETARDAMENTO DA COLHEITA NA OCORRÊNCIA DE FUNGOS PATOGÊNICOS, DE GRÃOS ARDIDOS E DE MICOTOXINAS	60
3.1. INTRODUÇÃO	60
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	64
3.2.1. Local e época	64
3.2.2. Experimento de campo	64
3.2.3. Amostragem de grãos	64
3.2.4. Determinação da umidade dos grãos	65
3.2.5. Incidência de grãos ardidos	65
3.2.6. Incidência de fungos patogênicos	66
3.2.7. Análise de micotoxinas	67
3.2.8. Delineamento experimental e análise estatística	68
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
3.3.1. Incidência de patógenos e de grãos ardidos	69
3.3.2. Contaminação por micotoxinas	73
3.4. CONCLUSÕES	74
4 EFEITO DO RETARDAMENTO DA COLHEITA E DE COBERTURA VERDE DO SOLO NA OCORRÊNCIA DE GRÃOS ARDIDOS E DE FUNGOS PATOGÊNICOS NO MILHO	76
4.1. INTRODUÇÃO	76
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	78
4.2.1. Local e época	78
4.2.2. Experimento de campo	79
4.2.3. Amostras de grãos	79
4.2.4. Determinação da umidade dos grãos	80
4.2.5. Incidência de grãos ardidos	80
4.2.6. Incidência de fungos patogênicos	81
4.2.7. Delineamento experimental e análise estatística	82
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
4.3.1. Incidência de grãos ardidos	82

4.3.2. Incidência de fungos patogênicos	85
4.3.2.1. Incidência de <i>Aspergillus</i> spp.	85
4.3.2.2. Incidência de <i>Cephalosporium</i> spp.	86
4.3.2.3. Incidência de <i>Fusarium graminearum</i>	89
4.3.2.4. Incidência de <i>Fusarium moniliforme</i>	90
4.3.2.5. Incidência de <i>Penicillium</i> spp.	91
4.4. CONCLUSÕES	94
5 QUALIDADE COMERCIAL DOS GRÃOS DE MILHO NAS REGIÕES DO PLANALTO MÉDIO E ALTO URUGUAI DO RIO GRANDE DO SUL.....	95
5.1. INTRODUÇÃO	95
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	98
5.2.1. Local e época	99
5.2.2. Experimento de campo	99
5.2.3. Amostragem de grãos na recepção dos silos	99
5.2.4. Amostragem de grãos na Escola Agrotécnica Federal de Sertão	100
...	
5.2.5. Determinação da umidade dos grãos	101
5.2.6. Incidência de grãos ardidos	101
5.2.7. Incidência de fungos patogênicos	101
5.2.8. Grãos Normais.....	102
5.2.9. Determinação da injúria mecânica visível	102
5.2.10. Delineamento experimental e análise estatística	103
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	104
5.3.1. Caracterização dos experimentos	103
5.3.2. Incidência de fungos patogênicos	107
5.3.3. Caracterização dos grãos	110
5.4. CONCLUSÕES	116
6 FUNGOS E MICOTOXINAS EM GRÃOS DE MILHO ARMAZENADOS A GRANEL COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE.....	118
6.1. INTRODUÇÃO	118
6.2. MATERIAL E MÉTODOS	121
6.2.1. Local e época	121
6.2.2. Experimento de campo	122
6.2.3. Amostragem de grãos	122
6.2.4. Armazenamento simulado	123
6.2.5. Amostragem dos grãos armazenados	124
6.2.6. Determinação de umidade dos grãos	125

6.2.7. Incidência de fungos patogênicos	125
6.2.8. Análise de micotoxinas	126
6.2.9. Delineamento experimental e análise estatística	128
6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	128
6.3.1. Incidência de fungos patogênicos	128
6.3.2. Contaminação por micotoxinas	137
6.4. CONCLUSÕES	140
7 EFEITO DO GRAU DE UMIDADE E DO PERÍODO DE ARMAZENAMENTO DE MILHO EM ESPIGAS NA INCIDÊNCIA DE FUNGOS E NA CONTAMINAÇÃO POR MICOTOXINAS	141
7.1. INTRODUÇÃO	141
7.2. MATERIAL E MÉTODOS	145
7.2.1. Local e época	145
7.2.2. Experimento de campo	145
7.2.3. Amostragem de grãos	145
7.2.4. Armazenamento simulado	146
7.2.5. Amostragem dos grãos armazenados	147
7.2.6. Determinação da umidade dos grãos	148
7.2.7. Incidência de grãos ardidos	148
7.2.8. Incidência de fungos patogênicos	148
7.2.9. Análise de micotoxinas	149
7.2.10. Delineamento experimental e análise estatística	151
7.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	151
7.3.1. Incidência de fungos patogênicos e de grãos ardidos	151
7.3.2. Incidência de fungos patogênicos nos grãos armazenados	154
7.3.3. Contaminação por micotoxinas	159
7.4. CONCLUSÕES	161
8 EFEITO DO ARMAZENAMENTO NA CONSERVAÇÃO DA QUALIDADE NUTRITIVA DOS GRÃOS DE MILHO EM SILOS VERTICAIS	162
8.1 INTRODUÇÃO.	162
8.2. MATERIAL E MÉTODOS	167
8.2.1. Local e época	167
8.2.2. Experimento de campo	168
8.2.3. Enchimento dos silos: Silo 3 - Cotrel; Silo 5 - Lodi	168
8.2.3.1. Lotes de grãos: Silo 3 - Cotrel; Silo 5 - Lodi	169
8.2.4. Processo de amostragem	169

8.2.5. Sistema de termometria	170
8.2.5.1. Silo 3 - Cotrel; Silo 5 - Lodi	170
8.2.6. Determinação da umidade dos grãos	171
8.2.7. Determinação do Peso Hectolitro.(PH) .dos grãos	172
8.2.8. Análise bromatológica dos grãos	172
8.2.9. Incidência de grãos ardidos	173
8.2.10. Incidência de fungos patogênicos	173
8.2.11. Determinação da injúria mecânica visível	174
8.2.12. Grãos normais	174
8.2.13. Análise de micotoxinas	175
8.2.14. Delineamento experimental e análise estatística	176
8.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	176
8.4. CONCLUSÃO	183
9.0. CONCLUSÕES GERAIS.....	184
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	185

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1 Relação do retardamento da colheita de grãos de milho com a contaminação por micotoxinas.....	74
1. Graus de umidade (%) dos grãos nas sete coletas a intervalos de nove dias dos híbridos XL 212 e XL 344 cultivados sobre as coberturas verdes do solo nabo forrageiro e aveia preta. Safra 99/00.....	83
1. Identificação dos híbridos coletados na recepção dos silos da empresa Lodi e das respectivas práticas de manejo das lavouras comerciais na safra agrícola 99/00.....	105
2 Identificação dos híbridos coletados na recepção dos silos da Cotrel e das respectivas práticas de manejo das lavouras comerciais na safra agrícola 99/00	106
3. Identificação dos híbridos coletados do experimento da EAFS na safra agrícola 99/00	106
4. Incidência média de fungos patogênicos em grãos híbridos coletados na recepção dos silos da Cotrel e de Lodi e em experimento na lavoura experimental da Escola Agrotécnica Federal de Sertão (EAFS) no qual os grãos foram colhidos manualmente e debulhados com trilhadeira no laboratório da UPF. Safra 99/00	109
5. Médias dos efeitos das práticas de manejo na caracterização dos grãos de milho de híbridos comerciais das regiões do Planalto Médio e do Alto Uruguai do RS. Os grãos foram coletados na recepção dos silos da empresa cerealista Lodi, da cooperativa Cotrel e na lavoura experimental da Escola Agrotécnica Federal da Sertão (EAFS). Safra 99/00	112
6. Percentagem de grãos normais (GN), e grãos com injúria mecânica visível (IMV) e incidência de grãos ardidos (GA) de milho de híbridos comerciais coletados na recepção dos silos da empresa Lodi. A média representa 35 híbridos de lavouras comerciais. C V% = 1,52 (GN); C V.% = 12,06 (GA); C V% = 7,32 (IMV). Safra 99/00	113

7. Percentagem de grãos normais (GN), grãos com injúria mecânica visível (IMV) e incidência de grãos ardidos (GA) de milho de híbridos comerciais coletados na recepção dos silos da cooperativa Cotrel. A média representa sete híbridos de lavouras comerciais. C V% = 1,64 (GN); C V% = 13,53 (GA); C V% = 7,91(IMV). Safra 99/00.....	114
8. Percentagem de grãos ardidos (GA) e a variação do teor de umidade (%) dos híbridos precoces cultivados no experimento da lavoura experimental da Escola Agrotécnica Federal de Sertão (EAFS). Os resultados representam a média de híbridos cultivados pelo sistema semeadura direta sobre cobertura verde de solo com aveia preta. C V % = 9,20 (GA). Safra 99/00.....	115
1. Resultados das análises de micotoxinas obtidos para as avaliações a intervalos de três meses, combinadas com a umidade dos grãos (%) e o tempo de armazenamento. Safra 98/99.....	139
1. Resultados das análises de micotoxinas obtidos para as combinações retardamento da colheita e umidade de coleta com o período de armazenamento dos grãos de milho em espigas a intervalos de três meses	161
1. Efeito do armazenamento sobre a incidência de grãos ardidos (GA) e a percentagem de grãos com injúria mecânica visível (IMV) e de grãos normais (GN) em milho durante cinco meses no silo 3 da Cotrel ¹ e seis meses do silo 5 de Lodi ² . Safra 99/00.....	178
2. Efeito do armazenamento na incidência de fungos em grãos de milho durante o intervalo de cinco meses no Silo 3 da Cotrel ¹ e seis meses no Silo 5 de Lodi ² . Safra 99/00	180
5 Efeito das condições de armazenamento, na conservação da qualidade nutritiva da matéria seca dos grãos durante cinco meses no Silo 3 da Cotrel ¹ e de seis meses no Silo 5 de Lodi ² . Safra 99/00.....	182

RELAÇÃO DE FIGURAS

1. Relação entre dias após a maturação fisiológica dos grãos de milho e a incidência (%) de fungos patogênicos e de grãos ardidos durante o período de retardamento do colheita	72
1- Incidência de grãos ardidos (GA) em grãos de milho maduros dos híbridos XL 212 e XL 344, em sete coletas com diferentes graus de umidade, após a maturação fisiológica, durante o retardamento da, e cultivados sobre as coberturas verdes do solo (Av = aveia preta e Na = nabo forrageiro). Safra 99/00.....	84
2 Incidência de <i>Aspergillus</i> spp. em grãos de milho dos híbridos XL 212 e XL 344 cultivados sobre as culturas verdes de solo (Av = aveia preta, Na = nabo forrageiro). Safra 99/00.....	86
3 Incidência de <i>Cephalosporium</i> spp. em grãos de milho dos híbridos XL 212 e XL 344 cultivados sobre as coberturas verde de solo (Av = aveia preta e Na = nabo forrageiro). Safra 99/00 ..	88
4. Incidência de <i>Fusarium graminearum</i> em grãos de milho dos híbridos XL 212 e XL 344 cultivados sobre coberturas verdes de solo (Av = aveia preta, Na = nabo forrageiro). Safra 99/00 ..	89
5 Incidência da espécie <i>Fusarium moniliforme</i> em grãos de milho dos híbridos XL 212 e XL 344 cultivados sobre as coberturas verdes de solo (Av = aveia preta, Na = nabo forrageiro). Safra 99/00.....	91
6. Incidência de <i>Penicillium</i> spp. em grãos de milho dos híbridos XL 212 e XL 344 cultivados sobre as coberturas verdes de solo (Av = aveia preta e Na = nabo forrageiro). Safra 99/00.....	93
1. Relação entre o período de armazenamento de grãos com 13,0% de umidade e a incidência de fungos patogênicos, avaliada a intervalos de três meses durante um ano. Grãos da safra 98/99..	130
2. Relação entre o período de armazenamento de grãos com 19,0% de umidade inicial e a incidência de fungos patogênicos avaliada a intervalos de três meses durante um ano. Safra 98/99	131
3. Relação entre o período de armazenamento de grãos com 17,5% de umidade inicial e a incidência de fungos patogênicos, avaliada a intervalos de três meses durante um ano. Safra 98/99	132

4. Relação entre o período de armazenamento de grãos com 15,0% de umidade inicial e a incidência de fungos patogênicos, avaliada a intervalos de três meses durante um ano. Safra 98/99	134
5. Relação entre o período de armazenamento de grãos com 13,5% de umidade e a incidência de fungos patogênicos, avaliada a intervalos de três meses durante um ano. Safra 98/99.....	135
6. Relação entre o período de armazenamento de grãos com 12,5% de umidade e a incidência de fungos patogênicos, avaliada a intervalos de três meses durante um ano. Safra 98/99	136
1. Relação entre o teor de umidade dos grãos de espigas de milho coletadas a intervalos de sete dias durante trinta dias e a incidência de grãos ardidos (GA) e de fungos na safra 98/99...	152
2. Relação entre o período de armazenamento de grãos de milho em espigas com umidade inicial de 20,5% e a incidência de fungos patogênicos e produtores de micotoxinas, avaliada a intervalo de três meses. Safra 98/99.....	155
3. Relação entre período de armazenamento de grãos de milho em espigas com umidade inicial de 19,5% e a incidência de fungos patogênicos e produtores de micotoxinas, avaliada a intervalo de três meses. Safra 98/99.....	156
4. Relação entre o período de armazenamento de grãos de milho em espigas com umidade inicial de 17,8% e a incidência de fungos patogênicos e produtores de micotoxinas, avaliada a intervalo de três meses. Safra 98/99.....	157
5. Relação entre período de armazenamento de grãos milho em espigas com umidade inicial de 17,6% e a incidência de fungos patogênicos e produtores de micotoxinas, avaliada a intervalo de três meses. Safra 98/99.....	158

1. INTRODUÇÃO

O milho está entre os cereais de maior importância social e econômica para a humanidade, pelo seu uso na alimentação humana e de animais. A sua crescente demanda exige atenção destacada dos centros de pesquisa de ciências agrárias no que tange às práticas culturais, aos sistemas de armazenamento e conservação de grãos, bem como ao melhoramento genético da cultura em relação ao rendimento, à tolerância às doenças e às qualidades nutritivas.

No âmbito mundial, a produção alcançou o volume superior a seiscentos milhões de toneladas na safra 99/00. Os Estados Unidos contribuem com cerca de 42% do total mundial. A China, ocupa o segundo lugar, com 125 milhões de toneladas, e o Brasil, o terceiro, com mais de quarenta milhões na safra 2000/2001. O milho situa-se como a primeira cultura em volume de produção, em comparação com o trigo, o arroz e a soja.

A cultura do milho tem, para o Brasil, importância socioeconômica significativa por ocupar cerca de 12 milhões de hectares de área plantada na safra 99/00. No Rio Grande do Sul, ocupa cerca de 26% do total das áreas com cultivos de grãos de primavera-verão e esteve presente em mais de trezentas mil propriedades rurais na safra 98/99, com uma produção de 4,5 milhões de toneladas.

Entretanto, o rendimento brasileiro, de 2,7 t/ha, na safra 98/99, revelou-se baixo, se comparado ao de países de maior expressão produtiva, como Estados Unidos, com 8,3 t/ha, e França, com 7,75 t/ha.

O milho é suscetível a várias doenças, causadas especialmente por fungos, que podem afetar a qualidade e o rendimento de grãos. As doenças de podridões de espigas, que podem originar os grãos ardidos, ocorrem praticamente em todas as regiões onde se cultiva o milho e têm como principais agentes causais espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Diplodia*, *Fusarium* e *Penicillium*.

Essas doenças podem interferir na classificação comercial do produto ao se estabelecer o preço de compra e venda. Nessa etapa, o milho em forma de grãos é qualificado de acordo com as suas características de sanidade, de grãos ardidos, de injúria mecânica, pela presença de impurezas e pelo grau de umidade dos grãos e, muito raramente, por características genéticas, que podem representar um fator de qualidade superior.

A colonização sintomática por fungos, que normalmente, origina os grãos ardidos, causa redução de matéria seca, em virtude da utilização das reversas de carboidratos e das qualidades funcionais, como proteínas, lipídios, vitaminas e outras reservas, diminuindo o valor nutritivo e a digestibilidade. Tais danos raramente são mensurados nos grãos que estão no mercado. Nesse contexto, o milho representa um volume quantitativo de produto, contudo a qualidade pode estar longe de atender as necessidades do consumidor.

O emprego de práticas de manejos para impedir a infecção dos grãos por patógenos pode reduzir a ocorrência de podridões de espigas e de micotoxinas, as quais são produzidas sobretudo por fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. As principais micotoxinas relatadas em milho são as aflatoxinas, a esterigmatocistina, o deoxinivalenol, as fumonisinas, o nivalenol, as ocrotocinas, a toxina T2 e a zearalenona.

As micotoxinas compreendem um conjunto complexo de substâncias tóxicas, produzidas por fungos e caracterizadas como metabólitos secundários. Essas substâncias constituem um dos problemas sanitários mais sérios para a pecuária, especialmente para a suinocultura e a avicultura. Enormes prejuízos econômicos são decorrentes da utilização de alimentos contaminados por essas substâncias tóxicas, porém não têm sido rotineiramente quantificados. Portanto, o conhecimento das micotoxinas e de seus efeitos é indispensável para médicos, médicos veterinários e todos os profissionais ligados à produção de alimentos, à saúde humana e animal.

O grau de umidade dos grãos é importante na colheita, na compra, no recebimento, na secagem e no armazenamento. O fator umidade influencia no tempo de armazenamento, no valor econômico e nas propriedades químicas e biológicas dos grãos.

O armazenamento de grãos em silos é uma etapa importante e obrigatória para a maioria dos produtores de grãos e tem por objetivo a conservação dos grãos em condições de manterem a quantidade e a qualidade nutritiva até o momento do consumo. Os fatores que mais

interferem na qualidade do armazenamento são teor de umidade dos grãos, composição química, umidade relativa do ar, temperatura da massa de grãos, danos mecânicos, impurezas, insetos e fungos patogênicos.

Neste trabalho, objetivou-se caracterizar a influência de fungos de pré e pós colheita associada à práticas de manejo de cultivo, de colheita e de armazenamento na qualidade comercial e nutricional de grãos milho. Os objetivos foram estabelecidos mediante a hipótese de que ocorrência de fungos de pré e pós colheita associada à práticas de cultivo, de colheita e de armazenamento são os fatores que mais influenciam na qualidade nutricional e comercial de grãos de milho.

A pesquisa foi desenvolvida envolvendo a execução de experimentos com objetivos específicos, visando validar ou não as seguintes hipóteses: 1^a - a variação do grau de umidade dos grãos maduros no campo e o retardamento da colheita do milho influenciam na ocorrência de patógenos envolvidos com doenças de espigas e na contaminação por micotoxinas; 2^a - a incidência fungos patogênicos pode ter relação com a cobertura verde do solo e a variação do grau de umidade dos grãos maduros durante sua permanência na lavoura; 3^a - a colheita pode interferir na qualidade comercial de grãos de milho cultivados em lavouras comerciais; 4^a- o grau de umidade e o período de armazenamento dos grãos em bombonas influenciam o desenvolvimento de fungos patogênicos e a contaminação por micotoxinas; 5^a - a ocorrência de fungos patogênicos e a contaminação por micotoxinas em milho armazenado em espigas podem ser relacionados com a época de

colheita do milho, o grau de umidade e o tempo de armazenamento; 6^a - o período de armazenamento influencia na ocorrência dos fungos patogênicos e na conservação da qualidade comercial e nutritiva do milho armazenado.

Conforme a exposição dos objetivos e das hipóteses a pesquisa foi executada por meio de um conjunto de experimentos envolvendo práticas de cultivo da produção de grãos de milho e avaliando o retardamento da colheita dos grãos como fatores associadas à ocorrência de doenças causadas por fungos patogênicos e a contaminação dos grãos por micotoxinas. Após as avaliações relacionadas ao milho na lavoura, em bombonas, o milho foi armazenado a granel e em espigas, arranjos em tratamentos com o objetivo de dar continuidade as avaliações sobre a incidência de fungos patogênicos de pré e de pós colheita e à contaminação por micotoxinas. Um conjunto de experimentos foi executado com grãos de híbridos de lavouras comerciais, no qual, os grãos foram coletados na recepção e durante o armazenamento nos silos da cooperativa Tritícola de Erechim (Cotrel), em Erechim, na região do Alto Uruguai, e da empresa cerealista Lodi (Lodi), em Marau, na região do Planalto Médio do estado do Rio Grande do Sul. Nesses experimentos, foi avaliada o efeito dos danos causados pela colheita e a ocorrência de fungos patogênicos e a contaminação por micotoxinas durante o armazenamento do ponto de vista comercial e nutricional do produto.

CAPÍTULO II

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Considerações gerais

A diversidade dos sistemas de produção impostos à cultura do milho no Brasil, o seu cultivo em monocultura, o desrespeito às épocas adequadas de semeadura em diversas regiões produtoras e recomendações equivocadas de genótipos, entre outros fatores, têm contribuído para a ocorrência e o aumento de patógenos na lavoura (Dourado Neto & Fancelli, 2000).

A cultura de milho é atacada por uma série de doenças de espigas, algumas das quais se encontram amplamente distribuídas onde o milho é cultivado. Os danos causados por essas moléstias não foram ainda determinados no Brasil. Porém, é inegável o potencial de prejuízo que podem causar à cultura, não somente na produtividade, mas também na qualidade, na palatabilidade e no valor nutritivo dos grãos (McGee, 1988; Luz, 1995; Reis & Casa, 1996).

Na constituição do grão de milho encontram-se, em média, 60% de carboidratos, 10% de proteínas e 4% de lipídios, além de

vitaminas e minerais. Por essa razão, o cereal é a base de complexos industriais diversificados e tem relevante papel socioeconômico para muitas regiões do mundo (Fancelli, 1982; Nogueira Jr. et al., 1987).

A qualidade dos grãos de milho é alterada direta ou indiretamente quando infectados por fungos, visto que pode ocorrer a produção de micotoxinas, as quais, se ingeridas, ocasionam danos à saúde humana e animal (Marasas et al., 1984).

Da microbiota que coloniza grãos de milho, os fungos são os mais tolerantes à baixa disponibilidade de água e causam danos na qualidade pela destruição de matéria seca, consumo de carboidratos e utilização ou alteração de lipídios, de proteínas e de outras substâncias de reservas, alterando as propriedades organolépticas, reduzindo o valor nutritivo, e pela sua capacidade de produzir micotoxinas (Dhingra & Coelho Neto, 1998; Fonseca, 1999).

As doenças das espigas, característica de cada espécie de fungo, podem ser identificadas pela coloração e pelas frutificações do agente causal. Doenças com potencial de podridão de espigas (PE) e de grãos ardidos (GA) e de produção de micotoxinas são a podridão de aspergillus, podridão de diplodia, podridão de fusarium, podridão de giberela e podridão de penicilium. Outras doenças consideradas de menor importância são as podridões de cefalosporium, cladosporium, nigrospora, rizopus e trichoderma (Koehler & Boewe, 1957; Luz, 1995).

O ciclo de uma doença é caracterizado pela ocorrência de uma série de eventos sucessivos e ordenados, os quais incluem sobrevivência, disseminação, infecção, colonização e reprodução do patógeno (Agrios, 1997).

Os grãos são o principal mecanismo de sobrevivência e dispersão dos agentes causais de podridão de espigas e podridão de grãos, por serem as responsáveis pela introdução do patógeno na lavoura e nos silos (McGee, 1988; Casa et al., 1998).

Os principais patógenos causadores de PE e de GA, segundo Headrick & Pataky (1991), são *Fusarium moniliforme* Sheld., *F. moniliforme* var. *subglutinans* Wr. Reink, *F. graminearum* Scwabe, *Diplodia* (= *Stenocarpella*) *maydis* (Berk.) Sacc., *D. macrospora* Earle. Outros fungos envolvidos são *Cephalosporium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp. e *Nigrospora* spp. (McGee, 1988; Smith & White, 1988; Luz, 1995).

As micotoxinas são um conjunto de metabólitos secundários produzidos por fungos, que provocam uma resposta tóxica quando ingeridos pelo homem ou animais. Cerca de 350-400 micotoxinas, produzidas por mais de 350 espécies de fungos, já foram identificadas. Dessas, as aflatoxinas são as mais estudadas, tanto no Brasil como no resto do mundo (Bennett, 1987).

As micotoxinas de importância na agricultura são as aflatoxinas, esterigmatocistina, desoxinivalenol, fumonisinas, nivalenol, ocratoxina A, toxina T2 e zearalenona (Miller, 1995; Furlong, 1995).

A qualidade do milho com relação a grãos trincados, ardidos, mofados, micotoxinas e resíduos tóxicos não está garantida porque os sistemas oficiais de classificação não controlam adequadamente esses fatores (Setti, 1992).

Para Lima & Bellaver (2000), a tipificação dos grãos de milho do ponto de vista da qualidade nutricional é uma realidade e está ao alcance dos produtores de milho e de rações para aves e suínos pelo método de espectrometria de reflectância próxima do vermelho.

2.2 Microrganismos envolvidos com podridões de espigas e micotoxinas

As principais doenças associadas à cultura do milho no Brasil são causadas por vírus, bactérias e fungos, entretanto os fungos têm sido relatados como os mais importantes. Alguns fungos associados aos grãos, que colonizam o seu interior e/ou os tecidos superficiais, podem produzir micotoxinas e pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Diplodia*, *Fusarium* e *Penicillium* (McGee, 1988; Luz, 1995; Reis & Casa, 1996).

2.2.1 Posição sistemática dos fungos

Os fungos envolvidos com as PE e a produção de micotoxinas pertencem ao Reino Fúngico, subdivisão Amastigomycotina. Um grupo pertence à divisão Ascomycotina, classe Ascomycetes, ordem Eurotiales, família Eurotiaceae, e aos gêneros *Eurotium* e *Talaromyces*; ordem Diaporthales, família Nectriaceae, gênero *Gibberella*. Na fase anamórfica, pertencem à divisão Deuteromycotina, classe Deuteromycetes, ordem Moniliales, família Moniliaceae e aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*; família Tuberculariaceae, gênero *Fusarium*, ordem Sphaeropsidales, família Sphaeropsidaceae e gênero *Diplodia*. As espécies *Cephalosporium* spp. pertencem à divisão Amastigomycota, classe Deuteromycetes, subclasse Hyphomycetes, ordem Moniliales, família Moniliaceae, gênero *Cephalosporium* (Alexopoulos & Mims, 1979, Smith & White, 1988.).

2.3 Gênero *Aspergillus*

A deterioração de grãos de milho, com possível contaminação por micotoxinas, antes e após a colheita é causada por algumas espécies de fungos do gênero *Aspergillus* (Payne, 1983). As espécies *A. flavus* Link : Fr (Thom), *A. parasiticus* Speare, *A. glaucus* Link : Gray, *A. niger* Van Tiegh e *A. ochraceus* (Wilhelm) são as mais comuns (Smith & White, 1988).

2.3.1 Características morfológicas

Do gênero *Aspergillus* as principais espécies com potencial para produção de micotoxinas e podridão de espigas são *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger*, *A. glaucus*, *A. nomius* e *A. ochraceus* (Smith & White, 1988; Shurtleff, 1992).

O gênero *Aspergillus* apresenta conidióforos eretos, simples, com uma vesícula dilatada, globosa ou clavada na sua extremidade; sobre a vesícula são formadas as fiálides primárias e/ou secundárias. Os conídios são hialinos, unicelulares, globosos e coloridos. As espécies *A. ochraceus* apresentam cabeças amarelas globosas; *A. flavus* apresenta cabeça radial verde-amarela com esporos espinhosos e *A. parasiticus*, conidióforos menores que 500 µm. com cabeças verde-amareladas (Wicklow, 1983; Samson & Pitt, 1990).

2.3.2 Podridão de aspergilus

O fungo coloniza o estigma e invade o grão ainda em desenvolvimento. A idade do estigma é importante para o sucesso da colonização. O estágio mais suscetível parece ser após a polinização, quando apresenta cor marrom-amarelada, e, num curto espaço de tempo, a superfície do grão está colonizada. A infecção interna do grão ocorre durante o seu enchimento. Outros fungos também invadem a semente nessa fase, e os insetos têm papel importante no processo de infecção por fungos (Hesseltine & Bothast, 1977; Payne, 1983).

Os fungos das espécies *Aspergillus* spp. iniciam a invasão pela ponta da espiga, ainda na lavoura, e penetram no embrião; por consequência, os grãos infectados têm a germinação altamente reduzida. Na lavoura ou no armazém, os fungos descoloram o embrião danificando-o ou matando-o, o qual adquire coloração escura com o passar do tempo, reduzindo o valor comercial do produto. A doença caracteriza-se pela presença de um mofo pulverulento de cor preta, amarelo-esverdeada ou bronzeada, que cresce sobre e entre os grãos. Os grãos injuriados são colonizados mais facilmente (Payne, 1983; Luz, 1995; Lazzari, 1997).

2.3.3. Ciclo biológico de *Aspergillus*

2.3.3.1 Sobrevivência

Os fungos *Aspergillus ochraceus*, *A. flavus* e *A. parasiticus* sobrevivem na forma de escleródios e esporos associados à sementes, o solo, o ar, a restos culturais e em hospedeiros secundários (Wicklow, 1983).

Os fungos de armazenagem estão associados com os resíduos culturais, as partículas de solo, o ar, os grãos colhidos e grãos com altos teores de umidade (Reis & Casa, 1996; Agarwal & Sinclair, 1997).

a) Fontes de inóculo

As principais fontes de inóculo dos agentes causais de podridões de espigas e grãos ardidos em milho são as sementes, os restos

culturais, as plantas voluntárias, os hospedeiros secundários e o solo (Reis & Casa, 1996; Agarwal & Sinclair, 1997).

2.3.3.2 Disseminação

Os fungos do gênero *Aspergillus* possuem conídios pequenos, que medem cerca de 4-7 x 6-8 μm , razão pela qual podem ser transportados pelo vento a longas distâncias. Outras formas de disseminação são o transporte passivo dos insetos, substratos vegetais infectados ou infestados. Os esporos também são dispersos durante a colheita, no transporte, na limpeza, na secagem, na movimentação dos grãos nos silos e durante a aeração, sendo que o ar contaminado com esporos passa através da massa de grãos. Esses meios de disseminação contribuem, às vezes, para contaminar todo o lote armazenado (Smith & White, 1988).

a) Sítios de infecção

Os sítios de infecção nas plantas antes da colheita são os estigmas das espigas a partir do estágio de floração e o tecido do pedúnculo, que, por ser parenquimatoso, facilita a penetração do micélio. Nos armazéns, a infecção ocorre através do germe e do pericarpo (Payne 1983; Agarwal & Sinclair, 1997).

Os passos do crescimento do fungo nos estigmas externos e a subsequente infecção dos grãos não são bem conhecidos, porém num período de oito dias, as superfícies dos grãos estão infectadas e

colonizadas, especialmente por espécies de *A. flavus*, que são predominantes em relação às de *A. parasiticus*. A infecção interna ocorre mais tarde, no período de enchimento dos grãos, e também pode ser auxiliada pela ação de insetos (Payne 1983).

2.3.3.3 Penetração

Os esporos depositados sobre os sítios de infecção, tanto nas plantas na lavoura como nos grãos armazenados, dependem da umidade e da temperatura favoráveis para que ocorra a germinação. Os esporos germinam e emitem o pró-micélio, que penetra no substrato. A penetração da hifa ocorre via o tecido do pedúnculo, pelas injúrias do tegumento e pelos estigmas. As injúrias causadas por insetos e por danos mecânicos favorecem a penetração dos fungos no grão (Pantaleón et al., 1988; Agarwal & Sinclair, 1997).

2.3.3.4 Colonização

A colonização dos tecidos dos estigmas por *A. flavus* e *A. parasiticus* ocorre, predominantemente no período de polinização, quando estes são ricos em nutrientes. Dessa forma, os esporos depositados sobre os estigmas iniciam a germinação somente após a polinização. A germinação, seguida da penetração e da posterior colonização interna dos estigmas e da espiga, ocorre num período de até oito dias, após o início do processo infeccioso. No final dessa fase, estão infectadas as

adjacências da base dos grãos. A colonização do grão inicia-se pela extremidade, com a penetração da hifa pelo germe e endosperma (Marsh & Payne, 1981; Payne, 1983).

Após ocorrer a infecção do grão pelas espécies de *Aspergillus* spp., o processo de colonização ou deterioração é retomado sempre que as condições de umidade dos grãos e a temperatura favorecerem o desenvolvimento dos fungos (Payne, 1983; Lazzari, 1997).

2.3.3.5 Reprodução

Os fungos do gênero *Aspergillus* apresentam conidióforo ereto, simples e vesícula globosa no ápice, onde se formam fiálides e sobre as quais são produzidos os conídios unicelulares, que conduzem à reprodução assexuada do gênero (Samson & Pitt, 1990).

2.3.4 Micotoxinas de *Aspergillus*

2.3.4 1. Aflatoxinas

A palavra “aflatoxina” é utilizada para designar um grupo de 17 substâncias químicas, mas, via de regra, refere-se a quatro substâncias principais, que são denominadas de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂. Esses compostos emitem fluorescência, azul-violeta ou esverdeada, quando submetidas à luz ultravioleta 366nm e, por isso, são representadas pelas letras B (blue = azul) ou G (green = verde). Os índices 1 e 2 indicam a sua mobilidade cromatográfica (OMS, 1983).

Segundo Heathcote (1984), as aflatoxinas são metabólitos fúngicos secundários, que podem ser produzidos por algumas linhagens das espécies de *A. flavus* Linf ex Fries e *A. parasiticus* Speare. Essas substâncias são moléculas heterocíclicas, com átomos de oxigênio e anéis de difurano e, diferem entre si apenas por pequenas variações em sua composição e estrutura molecular.

Hesseltine et al. (1970) relataram que linhagens da espécie de *A. flavus* produzem somente aflatoxinas B₁ e B₂, ao passo que a espécie de *A. parasiticus* pode produzir as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂.

2.3.4. 2 Ocratoxinas

As ocratoxinas são definidas como um grupo de sete isocumarinas unidas por uma ligação amida ao grupo amino de uma L-β-fenilalanina, segundo Hald (1989).

De acordo com a OMS (1983), o grupo das ocratoxinas envolve sete compostos estruturalmente semelhantes, que incluem a ocratoxina A, a ocratoxina B, a ocratoxina C e ésteres metílicos e etílicos das ocratoxinas A e B.

Krogh (1977) define as ocratoxinas como um grupos de metabólitos secundários, que podem ser produzidos por seis espécies de fungos do gênero *Penicillium* e sete espécies do gênero *Aspergillus*. Entretanto, para Marquardt & Frohlich (1992), as únicas espécies

comfirmadamente produtoras de ocratoxina A são *P. verrucosum* e *A. ochraceus* (= *A. alutaceus* Berkeley & Curtis).

2.3.5 Aflatoxicoses e ocratoxicoses

As aflatoxinas são cancerígenas e produzem muitos efeitos nocivos à saúde de animais domésticos, aves e suínos, incluindo a má absorção de vários nutrientes, coagulopatia, redução da integridade dos tecidos, redução no crescimento, má eficiência de conversão alimentar, incremento à suscetibilidade a infecções devidas à imunossupressão, ineficiência da ação de vacinas e fármacos, reduções na reprodução (Fonseca, 1999; Machado, 1999).

De acordo com Schmidt & Esser (1985), as aflatoxinas produzidas pelos fungos *A. flavus* e *A. parasiticus* são consideradas as substâncias naturais mais carcinogênicas. Apesar de sua importância médica e econômica, nos países do Terceiro Mundo não existem dados conhecidos sobre métodos efetivos de controle.

A ocratoxina A apresenta potencial carcinogênico para os suínos, causando-lhes nefropatia. A toxina pode ser teratogênica e potente supressora do sistema imunológico em aves, atuando na redução da conversão alimentar e no aumento do índice de mortalidade. É genotóxica para mamíferos (Marquardt & Frohlich, 1992;).

Hayes (1981) relatou a formação de tumores em animais de laboratório e o aparecimento de sintomas nefrotóxicos e teratogênicos

induzidos pela ocratoxina A. A Organização Mundial da Saúde (OMS, 1983) classifica a ocratoxina A como de potencial carcinogênico.

2.4 Gênero *Cephalosporium*

As espécies do gênero *Cephalosporium* são agentes causais de infecção e de colonização de grãos de milho na lavoura e, possivelmente, da podridão de espigas e de grãos ardidos, com formação de toxinas do tipo tricotecenos. Embora pouco estudado, é um fungo que tem revelado alta incidência. As características morfológicas do patógeno apontam várias espécies do gênero com denominações sinônimas, como *Cephalosporium acremonium* Auct. Non Corda sensu Grütz [(= *Acremonium kiliense* Grütz; = *C. kiliense* Grütz; = *A. keio* Nakamura & Takatsuki; = *C. maydis* Samra, Sabet & Hingorani; = *C. madure* Padhye, Sukapure & Thirumalachar; = *Papulaspora manganica* Beijerinck)] (Shurtleff, 1980; Brady, 1983).

2.4.1 Características morfológicas

A espécie *C. acremonium* apresenta conídios hialinos, unicelulares, elípticos ou ablongos, retos ou curvos, medindo 3,2-9,6 x 1,2-3,2 μm , produzidos em matriz mucilaginosa, situados no ápice de conidióforos curtos. Os conidióforos são septados, medindo 19,2 - 105,6 μm de comprimento. As hifas são septadas, profusamente ramificadas e pouco elevadas; forma clamidósporos (Shurtleff, 1980; Brady, 1983).

2.4.2 Podridão de *Cephalosporium*

O fungo encontra-se associado a sementes de milho e ao solo (Domsch et al., 1980; Shurtleff, 1980; Reis & Casa, 1996; Pinto, 1998). Brady (1983) relata sintomas em folhas e colmos com cores vermelhas e a múltipla produção de espigas imperfeitas, causadas pela espécie de *C. acremonium*.

Pinto et al. (1991) observaram a murcha do milho, e Casa et al. (1998) e Trento (2000) relataram incidências de *Cephalosporium* spp. em grãos de milho provenientes de lavouras, porém não se referem à epidemiologia, à patogenicidade e à característica da doença nas espigas e nos grãos. A falta de estudo sobre as doenças causadas por esse gênero de fungos impossibilita que se faça uma análise mais detalhada e conclusiva sobre seu ciclo de vida.

2.4.3 Ciclo biológico de *Cephalosporium*

2.4.3.1 Sobrevivência

O fungo *Cephalosporium acremonium* sobrevive no solo na forma de clamidósporos e nas sementes na forma de micélio (Domsch et al., 1980; Shurtleff, 1980; Pinto, 1998).

a) Fontes de inóculo

A espécie *C. acremonium* é habitante natural do solo (Shurtleff, 1980), sendo encontrada também na forma de clamidósporos e na forma de micélio em sementes infectadas (Brady, 1983; Pinto, 1998).

2.4.3.2 Disseminação

As espécies de *Cephalosporium* são disseminadas através do solo e das sementes infectadas (Brady, 1983).

A disseminação das espécies de *Cephalosporium* spp. ocorre principalmente através de sementes infectadas (Reis & Casa, 1996; Pinto 1998). O inóculo presente no solo pode infectar raízes e o mesocótilo das plantas (Shurtleff, 1980).

a) Sítios de infecção

A espécie *Cephalosporium maydis* infecta mais facilmente plântulas de milho que as plantas adultas e ocorre através das raízes ou do mesocótilo (Brady, 1983).

Manns & Adams (1923) localizaram o micélio de *C. acremonium* na testa do grão infectado. Koehler (1942) identificou a rota percorrida pelo fungo no interior do grão após a infecção, que inicia via estigmas; após ingressar na espiga, o patógeno desenvolve o micélio, que penetra no grão via embrião para, na seqüência, infectar as regiões do amido farináceo ou endosperma.

2.4.3.3 Penetração

O fungo infecta os grãos via estigmas e produz o apressório no sítio de infecção, que causa colapso nos tecidos infectados (Brady, 1983).

2.4.3.4 Colonização

Após a penetração, via raízes, o fungo desenvolve-se no xilema. O crescimento é lento no início e acelerado quando emergem a espiga e o pendão da planta. O fungo é também associado ao solo e causa a podridão da semente e morte antes da emergência (Brady, 1983).

A colonização dos estigmas por *C. acremonium* ocorre no período de polinização e, nos grãos, inicia-se pela extremidade, região do funículo, seguida da penetração pelo hilo e germe. A segunda fase da colonização é a penetração das hifas no amido farináceo e, por último, no amido córneo (Koehler, 1942).

2.4.3.5 Reprodução

As células conidiogênicas fialídicas são, em sua maioria, solitárias, ocasionalmente sobre conidióforos esparsamente ramificados em seu ápice. As espécies de *Cephalosporium* podem ser reproduzidas por esporos, que são produzidos solitariamente nas extremidades das fiálides e agregados no interior de cabeças mucilaginosas. Outra forma de reprodução é através de clamidósporos, que são intercalares ou terminais,

no micélio geralmente formados solitariamente, ocasionalmente em cadeias curtas (Brady, 1983).

2.4.4 Micotoxinas de *Cephalosporium*

2.4.4.1 Tricotecenos

Tricoteceno é um nome genérico que designa um grupo superior a cem micotoxinas que são produzidas por espécies de fungos dos gêneros *Acremonium* (*Cephalosporium*), *Cylindrocarpon*, *Dendrodochium*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Trichotecium* e *Fusarium* (Ciegler, 1978; Snyder, 1986).

Freman & Morrison (apud Ueno, 1983) isolaram o primeiro composto desse grupo, o tricotecim, uma substância produzida pelo fungo da espécie *Trichotecium roseum*.

O nome “tricoteceno” para a estrutura desses metabólitos, caracterizada por um esqueleto tricíclico, formado por ciclohexano, ciclopentano, um anel furanóico e grupos metila substituindo alguns carbono dos anéis, foi sugerido por Godtfredsen na década de 1970 (Ueno, 1983).

Os tricotecenos são anéis tricotecanos que apresentam uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 10 e um grupamento epóxido nas posições doze e treze da estrutura molecular. Os substituintes, tais como hidrogênios, hidroxilas, acilas, epóxidos ou ésteres, podem estar presentes nos carbonos 3, 4, 7, 8, 14 e 15 (Snyder, 1986; Ueno, 1986)

Considerando os substituintes dos grupos metila dos carbonos dos anéis, os tricotecenos foram denominados de toxina T2, diacetoxiscirpenol, nivalenol, deoxinivalenol ou vomitoxina (DON), roridina, verrucarina, satratoxina, etc. (Scott, 1988).

2.4.5 Toxicoses de tricotecenos

Os sintomas característicos dos efeitos tóxicos agudos dos tricotecenos em humanos e animais são vômitos, diarréia, anorexia, alterações hematológicas, angina necrótica, distúrbios neurológicos, destruição da medula óssea e hemorragia generalizada, seguidos ou não de morte (Ueno, 1983; Snyder, 1986;).

2.5. Gênero *Diplodia*

A podridão-branca da espiga ou podridão de diplodia (Shurtleff, 1980) é causada pelas espécies *Diplodia maydis* (Berk.) Sacc.[= *Stenocarpella maydis* (Berk.) Sutton; *D. zae* (Schw.) Lév.] e *D. macrospora* Earle. (Tanaka & Balmer, 1980; McGee, 1988).

2.5.1 Características morfológicas

O fungo *Diplodia maydis* produz picnídios globosos, contendo conídios com coloração pardo-oliva, elípticos, bicelulados, retos a ligeiramente curvados, medindo 5-6 x 25-30 μm (Marasas, 1977; Flett et al., 1992).

2.5.2 Podridão de diplodia

A podridão de diplodia ocorre com frequência na região Sul do Brasil, em razão do clima quente e úmido no período de cultivo da cultura do milho. A doença é mais severa quando a infecção ocorre logo após a fecundação, seguida das condições meteorológicas, como alta umidade e temperatura (Luz, 1995).

Nas espigas infectadas cedo, as brácteas despigmentam e ficam esbranquiçadas ou com cor de palha seca, contrastando com as espigas saudáveis. Se a infecção ocorrer duas semanas após a polinização, toda a espiga pode apodrecer tornando-se da cor marrom-acinzentada, leve, enrugada e completamente podre. Picnídios negros, podem formar-se sobre a palha, brácteas florais, sabugo e grãos. Estas espigas se mantêm em posição vertical, com as palhas internas fortemente aderidas umas às outras ou aos grãos por causa do desenvolvimento do micélio. A infecção tardia não mostra sintomas externos (Luz, 1995; Reis & Casa, 1996).

2.5.3. Ciclo biológico de *Diplodia*

2.5.3.1 Sobrevivência

O fungo *D. maydis* sobrevive em restos culturais do milho, na forma de conídios no interior de picnídios, e em grãos e sementes armazenadas, na forma de micélio. Não possuem hospedeiros secundários (Ullstrup, 1964; Smith & White, 1988; Reis & Casa, 1996).

a) Fontes de inóculo

As sementes e os restos culturais do milho infectados se constituem na principal fonte de inóculo primário. Os patógenos não possuem hospedeiros secundários (Mc Gee, 1988; Reis & Casa, 1996).

2.5.3.2 Disseminação

A liberação do inóculo de *D. maydis* ocorre com clima úmido e quente, condição na qual os conídios são liberados dos picnídios na forma de cirros longos. Esses conídios são disseminados pelos respingos da chuva, pelo vento e, provavelmente, por insetos (Ullstrup, 1964; Shurtleff, 1992; Reis & Casa, 1996).

a) Sítios de infecção

Os conídios de *D. maydis* são dispersos pelo vento e pelas gotas da chuva depositando-se sobre as folhas, de onde são conduzidos pela água da chuva até as axilas das folhas. Encontrando condições adequadas, segundo Shurtleff, (1980), os conídios germinam e iniciam a infecção via pedúnculo, que é o principal sítio de entrada do patógeno (Bensch et al., 1992), embora infecções possam ocorrer via extremidade da espiga (Koehler, 1942).

2.5.3.3 Penetração

A penetração do patógeno ocorre sobretudo via pedúnculo e via extremidade da espiga (McGee, 1988; Luz, 1995).

2.5.3.4 Colonização

A colonização da *D. maydis* inicia-se pelo pedúnculo e progride da base da espiga em direção à extremidade apical, via tecidos do esclerênquima e da placenta, que culmina com a infecção do embrião (Bensch, 1995), e também do endosperma do grão, afetando, por consequência, a germinação da semente (Koehler, 1942).

O desenvolvimento de *D. maydis* é influenciado pela umidade dos tecidos dos grãos, entre 18 e 19%, e favorecido pelo clima seco nas primeiras fases do desenvolvimento do fungo e pela manutenção da temperatura entre 28 a 30 °C durante duas a três semanas após a polinização (Koehler, 1942).

2.5.3.5 Reprodução

A reprodução das espécies do gênero *Diplodia* ocorre via conídios, que são produzidos em picnídios localizados sobre os grãos e os restos culturais infectados (Koehler, 1942).

2.5.4 Micotoxinas de *Diplodia*

2.5.4. 1 Diplodiotoxina

Um metabólito tóxico denominado “diplodiotoxina” foi detectado em substratos colonizados por *D. maydis*. Porém, não há comprovação de que a toxina seja a responsável pelos quadros clínicos de

toxidez causados por *D. maydis* em bovinos, ovinos e patos que ingeriram alimentos e restos culturais colonizados por essa espécie de fungo (Steyn et al., 1972; Rabiè et al., 1985).

2.5.4.1 Diplodiose

A diplodiose é uma micotoxicose descrita originalmente na África do Sul, Rodésia e Zâmbia, causada por *D. maydis* em virtude da presença do patógeno em grãos e restos culturais de milho (Marasas, 1977).

A intoxicação é mais comum no inverno, de julho a setembro, em épocas de maior precipitação pluvial, quando os bovinos e, com maior frequência, ovinos se alimentam de restevras de milho, onde permanecem espigas de grãos colonizadas por *D. maydis* (Marasas, 1978; Riet-Corrêa et al., 1983).

A ausência de estudos sobre as toxicoses e seus efeitos relacionados com as espécies de substâncias tóxicas produzidas pelos fungos do gênero *Diplodia* não permite ampliar a discussão.

2.6 Gênero *Fusarium*

Ao gênero *Fusarium* pertencem as espécies *F. moniliforme* (teleom. *G. fujikuroi*), *F. moniliforme* var. *subglutinans* e *F. graminearum* (teleom. *G. zae*) (Alexopoulos & Mims, 1979; Menezes & Oliveira, 1993).

2.6.1 Características morfológicas

O fungo *F. moniliforme* apresenta microconídios fusóides, hialinos, unicelulares, produzidos em cadeias, na forma de monílias, 5 - 12 μ m x 1,5 - 2,5 μ m; ocasionalmente, podem formar septos. A formação de macroconídios é rara. Quando presentes, formam de três a sete septos com célula basal pedicelada e a célula apical curvada medindo 25-60 x 2,5-4 μ m. Não forma clamidósporos e a forma teleomórfica de *F. moniliforme* (= *G. fujikoroi*) ainda não foi encontrada no Brasil (Reis & Casa, 1996). A espécie *F. moniliforme* var. *subglutinans* apresenta microconídios em polifiálides, falsas cabeças, e não em cadeias. Os macroconídios são menores (Menezes & Oliveira, 1993).

O fungo *F. graminearum* (= *G. zae*) forma macroconídios distintos septados, medindo 4-6 x 30-60 μ m, hialinos ligeiramente curvados com extremidades afiladas, célula basal pedicelada. O agente causal da podridão-rosada da espiga, o fungo *F. graminearum*, forma peritécios com coloração negro-azulada, superficiais, contendo oito ascósporos arranjados obliquamente em uma fila. Os ascósporos são hialinos, com três septos, afilando no ápice, ligeiramente curvos, medindo 3-5 x 20-30 μ m (Shurtleff, 1980).

2.6.2 Podridões de fusarium

2.6.2.1 Podridão-rosada da base da espiga

Os agentes causais dessa doença são as espécies imperfeitas de *F. moniliforme* e *F. moniliforme* var. *subglutinans*, que normalmente iniciam o processo infeccioso pela base da espiga. Os sintomas da doença caracterizam-se pela presença de grãos com cor marrom-avermelhada, distribuídos isoladamente ou em grupos sobre a espiga. O micélio produz abundante número de microconídios e/ou conídios, e com o avanço da doença sobre os grãos, o micélio adquire um aspecto cotonoso e de coloração rosada (Dickson, 1957; McGee, 1988).

As espigas colonizadas por *F. moniliforme* e *F. moniliforme* var. *subglutinans* não apodrecem totalmente e os grãos infectados tardiamente apresentam estrias esbranquiçadas no pericarpo. É comum grãos infectados não apresentarem sintomas (McGee, 1988; Munkvold & Carlton, 1997).

Os sintomas causados por *F. moniliforme* var. *subglutinans* caracterizam-se por descoloração rosada dos grãos, podendo infectar pontas e grãos das espigas sem desenvolver sintoma visível, razão pela qual é denominada de “infecção assintomática” (Munkvold & Carlton, 1997). A infecção assintomática normalmente é superior à ocorrência de incidência sintomática pelas espécies de *Fusarium* em grãos de milho (Flett & Whener, 1991; Headrick & Pataky, 1991).

2.6.2.2 Podridão-rosada da ponta da espiga

A doença manifesta-se, inicialmente, pela presença de mofo de cor avermelhada ou rosa-forte na ponta da espiga e que progride em direção à base. Nas espigas infectadas precocemente, a doença pode progredir e atacar toda a espiga. Os sintomas também são caracterizados pela palha aderida às espigas em razão do desenvolvimento do fungo entre as brácteas interiores e os grãos, podendo as estruturas do fungo ser observadas sobre e entre os grãos, que apresentam coloração vermelho-rosada a marrom-avermelhada. Sobre os tecidos colonizados podem formar-se peritécios preto-azulados, característica do fungo *Gibberella* (Luz, 1995; Reis & Casa, 1996; Pereira, 1997).

2.6.3 Ciclos biológico de *Fusarium*

2.6.3.1 Sobrevivência

Os fungos *F. moniliforme* e *F. moniliforme* var. *subglutinans* sobrevivem em restos culturais, matéria orgânica no solo, sementes, hospedeiros secundários e plantas voluntárias na forma de conídios e micélio (Kohler, 1942; Warren & Kommedahl, 1973; McGee, 1988).

O fungo *F. graminearum* (= *G. zaeae*) sobrevive na forma de ascósporos no interior dos peritécios nos restos culturais e nos hospedeiros secundários e em sementes na forma de micélio (McGee, 1988; Reis & Casa, 1996).

a) Fontes de inóculo

A colonização saprofítica de restos culturais por *F. moniliforme*, *F. moniliforme* var. *subglutinans* e *F. graminearum* atua como fonte de inóculo e contribui para a alta incidência das podridões de espigas e de grãos ardidos. Resíduos de plantas e matéria orgânica no solo são fontes de inóculo das espécies *F. moniliforme* e *F. subglutinans* (Warren & Kommedahl, 1973). Peritécios sobre restos culturais constituem-se em fontes de inóculo. Sementes e restos culturais de plantas suscetíveis, como arroz, aveia, cevada, milho e trigo, atuam como fonte de inóculo (McGee, 1988; Reis & Casa, 1996).

2.6.3.2 Disseminação

As sementes infectadas são portadoras de micélio dormente e constituem-se num dos principais mecanismos de sobrevivência e de disseminação dos patógenos causadores das PEs e de GAs, especialmente a grandes distâncias e para regiões isentas de patógenos (Shurtleff, 1980).

Os conídios de *F. moniliforme* e *F. subglutinans* podem ser transportados pelo vento dentro e entre plantações de milho (Nelson, 1993), sendo a dispersão do patógeno favorecida por tempo seco e quente. Chuva e insetos também são agentes disseminadores (Ooka & Kommedahl, 1977).

A disseminação do *F. graminearum* é favorecida em condições de clima quente e úmido pela formação de peritécios sobre os tecidos infectados (Shurtleff, 1992). Os ascosporos e macroconídios maduros são

liberados no ar e transportados pelo vento, chuva e insetos, depositando-se sobre as plantas (Flett & Wehner, 1991; Reis & Casa, 1996).

a) Sítios de infecção

O inóculo transportado pelo vento é depositado nos estigmas florais, local onde os esporos germinam e o pró-micélio penetra nos estigmas iniciando a colonização. A infecção é favorecida pela presença de grãos de pólen e estigmas expostos (Hesseltine & Bothast, 1977; Reis & Casa, 1996).

2.6.3.3 Penetração

A penetração dos fungos do gênero *Fusarium* no grão ocorre com a germinação dos esporos, emissão do pró-micélio e a formação dos apressórios, que se fixam na superfície do hospedeiro e no ponto de contato, sobre os sítios de infecção, onde ocorrem a dissolução do tecido e a formação de orifício microscópico. Essa ação envolve enzimas celulíticas, hemicelulíticas e pectolíticas (Bensch et al., 1992).

2.6.3.4 Colonização

Após a penetração, inicia-se a colonização interna do hospedeiro. O micélio cresce entre as células dos grãos, condição intercelular, ou penetra dentro das células, condição intracelular. As células das hifas, quando em contato com o protoplasma do grão,

absorvem o alimento diretamente; já as hifas intercelulares absorvem o alimento difundido através da parede celular e por meio de órgãos especiais, denominados “haustórios”, que são estruturas formadas por células de hifas (Menezes & Oliveira, 1993).

Segundo Foley (1962), a colonização dentro da espiga pelo inóculo de *F. moniliforme* depositado sobre os estigmas pode contribuir para a infecção e colonização sistêmica do fungo em toda a espiga.

O processo de colonização por *F. graminearum* caracteriza-se pela invasão da espigas via extremidade apical, sendo os estigmas o canal de penetração do fungo. Após a infecção dos estigmas, o fungo progride até atingir o interior da espiga e se desenvolve em direção à base durante o estágio de enchimento do grão (McGee, 1988; Reis & Casa, 1996; Reid et al., 1999).

2.6.3.5 Reprodução

O gênero *Fusarium* apresenta conidióforos pouco ou bastante diferenciados, com ou sem ramificações ou, até mesmo, a célula conidiogênica saindo diretamente da hifa, sem conidióforo. Nesse gênero, há uma variação muito grande na estrutura de reprodução, de tal modo que numa única espécie podem ser encontrados vários tipos de conídios. A célula conidiogênica é do tipo fiálide, geralmente afilada, com ou sem colarete, lisa e hialina. Os conídios nascem das fiálides e ficam agrupados ao seu redor através de substância mucilaginosa. Algumas espécies

produzem conídios em cadeia que apresentam forma e tamanho muito variadas, mas todos são hialinos e lisos. Os conídios são divididos em microconídios e macroconídios, geralmente na forma de barquinhos septados (McGee, 1988; Menezes & Oliveira, 1993).

2.6.4 Micotoxinas de *Fusarium*

2.6.4.1 Fumonisinias

As “fumonisinias” constituem uma classe de micotoxinas formada por seis homólogos de fumonisina; estruturalmente, são relacionadas e, por isso, denominadas de FB₁, FB₂, FB₃, FB₄, FA₁ e FA₂. Destas, a fumonisina B₁ (FB₁) é a mais abundante e conhecida. Testes de laboratório demonstraram que FB₁, FB₂ e FB₃ possuem propriedades tóxicas e carcinogênicas semelhantes (Gelderblom et al., 1988; Cawood et al., 1991; Doko & Visconti, 1994).

Quimicamente, FB₁, a mais importante, é 2-amino-12, 16-dimetil-3, 5, 10-tri-hidroxi-14, 15 propano-1, 2, 3, tricarboxyicosane. As outras fumonisinias diferem entre si pela ausência de um dos grupamentos hidroxila livres na posição C-5 ou C-10 da cadeia estrutural principal (Bezuidenhout et al., 1988; Gelderblom et al., 1988).

2.6.4.2 Tricotecenos: Deoxinivalenol, Nivalenol e Toxina

T2.

Deoxinivalenol (DON ou vomitoxina), nivalenol e Toxina T-2 fazem parte dos tricotecenos, um grupo de cerca de cem micotoxinas, das quais o deoxinivalenol é o mais comum. Todos os tricotecenos naturais têm sesquiterpeno tetracíclico como estrutura básica e diferem entre si apenas por possuírem H ou OH nos radicais ligados nas diferentes posições dos anéis tricotecanos. Os tricotecenos têm um núcleo químico comum e com pequenas variações nos seus radicais, podendo dar origem a uma centena de diferentes compostos tóxicos. Cada fungo pode produzir mais de um tricoteceno na colonização de um substrato e nem sempre produzem os mesmos compostos (Ueno, 1983).

2.6.4.3 Zearalenona

Quimicamente, a zearalenona é uma lactona de ácido fenólico resorcílico, com características de hormônio estrogênico, que apresenta uma fluorescência azul-esverdeada, quando excitada com luz ultravioleta de ondas longas de 360nm e uma fluorescência verde mais intensa quando é excitada com luz ultravioleta de ondas curtas de 254nm (OMS, 1983).

2.6.4.4 Fusariotoxicoses

O surto clássico de fusariotoxicose em humanos que registrou casos fatais ocorreu após a Segunda Guerra Mundial. A população atingida consumiu alimentos produzidos a partir de grãos que não tinham sido colhidos durante o inverno europeu. Os sintomas da doença,

denominada de “aleucia tóxica alimentar”, foram febre, angina necrótica, leucopenia, destruição da medula óssea, seguidos de mortes. Posteriormente, atribuiu-se esses sintomas à presença de tricotecenos, pois foram semelhantes aos observados em estudos toxicológicos com estas micotoxinas (Osborne, 1982; Snyder, 1986; Ueno, 1986).

A fumonisina B1 causa a leucoencéfalo malácia em eqüinos, a síndrome do edema pulmonar em suínos, câncer no fígado em ratos, além de estar estatisticamente correlacionada com o aumento do risco de câncer do esôfago em humanos que consomem milho contaminado (Marasas, 1995).

A deoxinivalenol, também chamada de vomitoxina, em animais provoca gastrite, vômitos e recusa alimentar. A toxina T-2 e a nivalenol, em suínos e bovinos, provocam hemorragia do trato intestinal, degeneração da medula óssea e morte; nas aves, ocorre epitelionecrose da mucosa bucal, esôfago e estômago, encrustação no bico, gastroenterite e morte (Malozzi & Corrêa, 1998).

A zearalenona, produzida por várias espécies de *Fusarium* spp., causa hiperestrogenismo em suínos, os quais são mais sensíveis que bovinos, aves e animais de laboratório. A zearalenona causa efeitos também em humanos, alterando a idade em que as crianças atingem a puberdade (Coulombe, 1993; Miller, 1995).

2.7 Gênero *Penicillium*

Algumas espécies de importância econômica do gênero *Penicillium* são *P. verrucosum* Samsom, *P. veridicatum* Raper & Thom, *P. oxalicum* Currie & Thom, *P. expansum* Link, *P. funiculosum* Thom e *P. cyclopium* Thom. As espécies desses fungos encontram-se normalmente em sementes de milho (Smith & White, 1980; McGee, 1988; Luz, 1995).

2.7.1 Características morfológicas

As hifas vegetativas são septadas e hialinas. As ramificações férteis são mais ou menos perpendiculares à hifa e terminam em ápice na forma de vassoura com vértice nas fiálides. Os conidióforos são eretos, ramificados próximos ao ápice; conidiósporos não septados hialinos ou coloridos em massa, unicelulares, são produzidos em cadeias basípetas. A espécie *P. veridicatum* confere a cor verde aos grãos de milho, pelo crescimento de micélio de cor verde-amarelada e esporos rugosos (McGee, 1988; Samson & Pitt, 1990; Menezes & Oliveira, 1993).

2.7.2 Podridão de penicilium

Os sintomas da doença aparecem no sabugo e nos grãos, caracterizados pela cor verde, amarelo-esverdeada ou azul-esverdeada a oliva do micélio, que cresce sobre o sabugo e sobre e entre os grãos das espigas danificadas mecanicamente ou por insetos (Mislivec & Tuite, 1970; McGee, 1988; Luz, 1995).

No armazém, a invasão e a colonização causam a redução do vigor da semente, seguida das descoloração do germe, do emboloramento e do empedramento, elevando a temperatura e a umidade da massa dos grãos armazenados (Lazzari, 1997).

2.7.3 Ciclo biológico de *Penicillium*

2.7.3.1 Sobrevivência

Os fungos do gênero *Penicillium* são cosmopolitas e, na forma de esporos, sobrevivem no ar, no solo e associados a grãos armazenados, a restos culturais e fragmentos de colheita (Christensen, 1980; Moreno & Zamora, 1986; McGee, 1988).

a) Fontes de inóculo

Os fungos do gênero *Penicillium* são considerados fungos de armazém, entretanto estão presentes em restos culturais infectados na superfície do solo das lavouras, em detritos de colheita e partículas de solo entre os grãos colhidos e armazenados, os quais são considerados as principais fontes de inóculo (Ullstrup, 1964; Reis & Casa, 1999).

2.7.3.2 Disseminação

Para Reis e Casa (1999), os esporos são dispersos durante a colheita mecânica na lavoura. No silo, nos processos de secagem, de transilagem, de carga, de descarga e de peneiramento, o ar que é contaminado pelos esporos circula através da massa de grãos,

disseminando e infestando os grãos sadios. Outro fator a ser considerado são as próprias sementes infectadas oriundas de lavouras.

a) Sítios de infecção

O processo de infecção pode ser iniciado pela deposição dos esporos sobre os estigmas no estágio de fecundação ou por injúrias na ponta da espiga. A germinação dos esporos é seguida pela penetração do patógeno, que se instala na extremidade do óvulo, junto ao funículo. A infecção, que ocorre durante o enchimento dos grãos, causa lesões no tegumento ou pericarpo, provocando a podridão das espigas e listras nos grãos (Agarwal & Sinclair, 1997; Reis e Casa, 1999).

2.7.3.3 Penetração

Os conídios depositados sobre os sítios de infecção tanto na lavoura como no armazém, encontrando condições de umidade e temperatura, germinam, emitem o pró-micélio e penetram no substrato. A penetração do fungo pode ocorrer via micrópila ou pedúnculo do grão, por injúrias microscópicas na superfície do grão e, ainda, via estigmas (Pantaleón et al., 1988; Agarwal & Sinclair, 1997).

2.7.3.4 Colonização

Smith & White (1988) caracterizaram as espécies do gênero *Penicillium* pela sua capacidade de colonização das espigas no campo.

Concluíram que o *P. oxalicum* é uma espécie patogênica de campo, ao passo que a espécie *P. viridicatum*, produtora de micotoxinas, raramente coloniza espigas no campo, podendo ocorrer, mas com pouca frequência, quando a colheita for atrasada.

O processo de colonização de *P. viridicatum* nos armazéns é influenciado pela umidade dos grãos, que possibilita a germinação dos esporos, a emissão do pró-micélio que penetra através do funículo infectando o germe e posteriormente, o endosperma (Koehler, 1942; Mislivec & Tuite, 1970).

2.7.3.5 Reprodução

O gênero *Penicillium* reproduz-se através de conídios produzidos no ápice de conidióforos ramificados, na forma de vassoura, com fiálides (McGee, 1988).

2.7.4 Micotoxinas de *Penicillium*

De acordo com OMS (1983), o grupo das ocratoxinas envolve sete compostos estruturalmente semelhantes, que incluem a ocratoxina A, a ocratoxina B, a ocratoxina C e ésteres metílicos e etílicos das ocratoxinas A e B. Conforme Hald (1989), as ocratoxinas são definidas como um grupo de isocumarinas unidas por um ligação amida ao grupo amino de uma L- β -fenilalanina.

As espécies de fungos *P. viridicatum* e *P. verrucosum* produzem as micotoxinas ocratoxina A, B e C nos seguintes produtos agrícolas: amendoim, arroz, aveia, castanha do Pará, centeio, cevada feijão, milho, sarraceno, soja, sorgo e trigo (Rebelin, 1978; Marquardt & Frohlich 1992).

2.7.4.1 Ocratoxicoses

As ocratoxinas são tóxicas para bovinos, suínos, aves, eqüinos e ratos, causando os efeitos biológicos caracterizados por infiltração gordurosa no fígado, com degeneração hialina das células, necrose focal, nefropatia, formação de células cancerosas e teratogenia (Hayes, 1981; Marquardt & Frohlich, 1992; Malozzi & Corrêa, 1998).

2.8 Medidas de controle de doenças do milho

2.8.1 Princípios e métodos de controle de doenças

O controle de doenças em plantas é o mais importante objetivo da fitopatologia. Sem controle, doenças de plantas podem ocasionar enormes prejuízos, de conseqüências sociais muitas vezes catastróficas, envolvendo a morte de milhares de pessoas em conseqüência de fome e epidemias, como aconteceu no passado, conforme Bergamin Filho & Kimati (1995).

De acordo com o National Research Council (apud Kimati & Bergamin Filho, 1995), o controle de doenças de plantas consiste na

“redução da incidência ou severidade da doença”. Whetzel et al. e Whetzel (apud Kimati & Bergamin Filho, 1995) agruparam os métodos de controle em princípios caracterizados por exclusão, erradicação, proteção, imunização e terapia.

Marchionato, citado em Kimati & Bergamin Filho, (1995) sugeriu medidas de controle baseadas no fator ambiente através do princípio da regulação, e Kimati & Bergamin Filho (1995) referem-se a outras medidas de controle, não ajustáveis aos princípios de Whetzel, que são agrupadas no princípio de evasão.

Entre as estratégias que podem ser empregadas para o controle de doenças do milho destacam-se o controle genético, o controle biológico, a escolha de híbridos adequados ao solo e ao clima, a eliminação de plantas doentes, voluntárias e hospedeiros secundários, a época e local de semeadura, a população de plantas, a fertilização equilibrada, o tratamento de sementes, o preparo do solo, o emprego de espécies vegetais não suscetíveis em cobertura verde do solo associadas a rotação de culturas, o controle de plantas daninhas e de pragas, a colheita com umidade adequada, a regulagem adequada da máquina colhedora conforme o tipo de grão, a colheita com umidade adequada dos grãos e secagem dos grãos a umidade entre 12 e 13% imediatamente após a colheita (Bettioli & Ghini, 1995; Camargo & Bergamin Filho, 1995; Pereira, 1995; Reis & Forcelini, 1995).

As medidas de conservação pós-colheita iniciam-se pelo transporte adequado para o silo; limpeza; secagem; temperatura de secagem adequada para evitar fissuras e descoloração dos grãos; aeração; manutenção de umidade dos grãos entre 13-14,5% no armazenamento; monitoramento periódico das condições de temperatura, de umidade e micológicas; manutenção da umidade relativa intergranular entre 65 e 70%; controle da presença de insetos; limpeza e desinfestação periódica do silo e evitação de períodos prolongados ou superiores a um ano de armazenamento (Moreno & Zamora, 1986; Puzzi, 1989; Weber, 1998; Eichelberger, 2000).

2.8.2 Controle genético

Para Camargo & Bergamin Filho (1995), o emprego da resistência genética no controle de doenças vegetais representa um dos mais significativos avanços tecnológicos da agricultura. O uso de cultivares resistentes a doenças é o método de controle preferido por ser o mais barato e de mais fácil aplicação.

Em razão da complexidade das interações do genótipo com os fatores bióticos e abióticos, a melhor estratégia de seleção de plantas de milho poderia ser a construção de um índice de seleção que levasse em consideração, de forma ponderada, os diversos fatores envolvidos. Observou-se também que qualquer estratégia de controle da contaminação por micotoxinas precisaria incluir componentes de manejo genético e

ambiental, uma vez que nenhum dos componentes, isoladamente, parece predominante (Widstrom et al., 1986; Klapproth & Hawk, 1991).

Hoernisch & Davis (1994) sugerem que a espessura do pericarpo e da camada de aleurona dos grãos em estágio precoce de enchimento do grão, mas depois do estágio leitoso, pode ser usada como indicador para separar os híbridos resistentes dos suscetíveis às doenças das podridões.

Por causa dos prejuízos causados pela ação de insetos e fungos na qualidade do milho, os geneticistas procuram melhorar as características de sanidade das plantas, dando-lhe melhor empalhamento e preferindo os grãos duros e semiduros aos grãos moles (Lima & Bellaver, 2000).

2.8.3 Escolha do híbrido

A escolha correta de cultivares na implantação de uma lavoura de milho pode representar acréscimos significativos na produção. Os tipos de cultivares utilizados no estado do Rio Grande do Sul são as variedades e os híbridos agrupados de acordo com as exigências calóricas necessárias ao cumprimento das etapas fenológicas compreendidas entre a emergência e o início da polinização (Programa ..., 1999; Dourado Neto & Fancelli, 2000).

O produtor deve fazer a seleção entre os cultivares indicados com o auxílio de técnicos, não podendo esquecer de considerar as

características de clima e solo de sua região, a finalidade da produção, bem como a intensidade de uso de outros insumos (Dowswell et al., 1996; Dourado Neto & Fancelli, 2000).

Para a Pioneer (1998), três fatores são fundamentais tanto para caracterizar os híbridos como para descrever as necessidades do produtor na lavoura. O potencial produtivo é a constituição genética que o híbrido possui em termos de expressar a sua capacidade de produção; precocidade é a rapidez com que ele chega a uma certa umidade de colheita, e defensividade é a capacidade que possui de tolerar melhor situações adversas. A escolha do híbrido deve ser feita de acordo com as necessidades e a finalidade da produção.

2.8.4 Rotação de culturas

Rotação de culturas do ponto de vista fitopatológico constitui-se na prática de não plantar a mesma espécie vegetal na mesma área da lavoura todos os anos, até que ocorra a completa decomposição de seus tecidos ou restos culturais, e visa assegurar a estabilidade produtiva do agroecossistema (Reis & Forcelini, 1995; Reis & Casa, 1996).

Os agentes causais de podridões de espigas controláveis pela rotação de culturas são aqueles que sobrevivem pela colonização saprofítica dos resíduos culturais do milho e não apresentam estruturas de resistência, as quais poderiam mantê-los viáveis por vários anos no solo (Reis & Casa, 1996).

As podridões de espigas geralmente estão relacionadas com os patógenos necrotróficos (Ullstrup, 1964); assim, uma das principais medidas para a sua redução é o emprego da rotação de culturas com espécies não suscetíveis (Shurtleff, 1992).

Del Rio & Melara (1991) relatam a redução de 80% na incidência de podridão de espiga causada por *D. maydis* em plantas cultivadas em rotação de cultura situadas 20 m distantes da fonte de inóculo.

2.8.5 População de plantas

De acordo com Dourado Neto & Fancelli (2000), a definição da população de plantas por hectare deve levar em consideração a finalidade de produção, a época de semeadura, o nível de fertilização, o sistema de produção e as características genético-fisiológicas do híbrido escolhido.

Para Fonseca (1999), a população elevada de plantas determina uma maior competição pela água, pelos nutrientes e pela luminosidade, que, associada à deficiência ou ao desequilíbrio de N e K, pode contribuir para o aumento da incidência das podridões de espigas e de grãos ardidos em milho.

2.8.6 Colheita

Programa... (1999) e Dourado Neto & Fancelli (2000) consideram a colheita, depois da implantação bem-sucedida da lavoura, a operação mais importante do processo produtivo da cultura do milho, visto que a colheita bem conduzida conserva a quantidade e a qualidade nutritiva dos grãos.

Ao grãos fisiologicamente maduros são caracterizados por apresentarem do peso máximo da matéria seca e máxima atividade fisiológica, sendo facilmente reconhecidas pela presença de uma camada negra formada no ponto de inserção do grão com o sabugo. Nesse momento, rompe-se o elo de ligação entre a planta e o fruto. Ao alcançar este estágio, os grãos poderiam ser colhidos, porém, em virtude da alta umidade neles presente, (entre 38 e 30%), a operação de colheita não deve ser efetuada. Todavia, é recomendado realizá-la tão logo os grãos alcancem a umidade de 26% (Eichelberger, 2000; Dourado Neto & Fancelli, 2000).

Para que a colheita possa ser bem planejada, é preciso conhecer a curva de secagem dos grãos de cada cultivar, híbrido ou variedade na lavoura, o que depende do ciclo, das condições climáticas e da época de plantio. Teoricamente, a colheita pode ser realizada a partir da maturação fisiológica do grão, porém, no caso do milho, é indicada quando a umidade nos grãos estiver entre 18 e 26% (Mantovani, 1989; Dourado Neto & Fancelli, 2000; Eichelberger, 2000).

Mantovani (1989) e Eichelberger (2000) consideram a operação de colheita a maior causa de danos mecânicos em grãos. Os dois fatores mais importantes e que permitem controlar os danos mecânicos na colheita são a escolha do grau de umidade dos grãos apropriada para a colheita e a regulagem correta da colhedora automotriz.

2.8.6.1 Regulagem da colhedora

Mantovani (1989) destaca cinco funções essenciais de uma colhedora de milho: a alimentação, a debulha, a separação, a limpeza e o manuseio do grão. A debulha é a função mais importante e exige muito cuidado na regulagem devendo ser regulada em conformidade com o teor de umidade no grão. Quando colhido mais úmido, o grão é menos duro e mais difícil de ser debulhado, por isso exige maior rotação do cilindro; à medida que o milho perde umidade, torna-se mais quebradiço, devendo, então, a rotação do debulhador ser diminuída.

Eichelberger (2000) destaca que a maior causa de danos mecânicos em grãos se localiza na colheita. Os dois fatores mais importantes e que permitem controlar os danos mecânicos nos grãos são a umidade ideal na colheita - para o milho é considerada 26% - e a correta regulagem da colhedora automotriz.

2.9. Medidas de conservação pós-colheita

2.9.1 Secagem

A secagem, processo de evaporação da água contida no grão mediante ação do calor, é uma operação importante do processamento pós-colheita dos grãos; por isso, o sistema de secagem deve ser controlado para se obter uma umidade final adequada e causar um mínimo de danos nos grãos (Mantovani & Fontes, 1989).

Bakker-Arkema (1993) aponta fatores biológicos na performance da secagem de grãos, entre os quais está o genótipo, que determina a taxa de secagem e a eficiência energética. A suscetibilidade à quebra e a danos na secagem também pode variar de genótipo para genótipo. Para o autor, a temperatura máxima para a secagem do milho é substancialmente maior do que para a cultura do trigo. Isso porque, quantidade de energia usada é influenciada pelos tipos de grãos.

O controle da temperatura é fundamental no processo de secagem dentro dos conceitos modernos da operação, para a obtenção de produtos com qualidade. O excesso de temperatura é responsável por danos mecânicos e por alterações na qualidade dos grãos; por sua vez, temperatura mais baixa resulta em maior demora de secagem, porém confere ao produto maior qualidade. A secagem é um fator econômico e deve ser efetuada a uma temperatura máxima, porém que não cause prejuízos à qualidade do grão. O milho destinado à alimentação animal tem a temperatura de secagem limitada a 82 °C (Eichelberger, 2000).

As temperaturas altas estão, via de regra, na faixa de 60 °C a 120 °C; as baixas situam-se em níveis de até 10 °C acima da temperatura ambiente (Moraes et al., 1996).

Segundo Brooker et al. (1992), quando se aumenta a temperatura do ar de secagem, este absorve mais umidade; assim, o fluxo de ar requerido por unidade de massa de grãos é menor para secadores a altas temperaturas do que para secadores a baixas temperaturas. Um fluxo de ar menor é vantajoso por reduzir o tamanho do motor e limitar a poluição do ar, além de melhorar o custo-benefício, mantendo a integridade dos grãos.

A secagem deve ser processada logo após a colheita e deve atingir os níveis de teor de umidade que impeçam o desenvolvimento de fungos, uma vez que, na secagem, a temperatura elevada pode causar trincamento nos grãos, propiciando condições favoráveis à invasão de microrganismos (Puzzi, 1989).

2.9.2. Armazenamento

Para Moreno & Zamora (1986), um silo de grãos é um sistema ecológico artificial onde organismos vivos e o meio ambiente que os cerca se interacionam. A conservação dos grãos armazenados deve-se ao resultado das interações de fatores físicos, químicos e biológicos.

O principal fator que influencia na conservação dos grãos armazenados é o teor de umidade, visto que o seu abaixamento faz com

que os grãos reduzam a respiração a níveis muito baixos, diminuindo o desgaste de reservas e a produção de calor (Eichelberger, 2000).

A manutenção das características nutritivas e da quantidade dos grãos durante o armazenamento depende de alguns fatores, como teor de umidade dos grãos abaixo do índice de multiplicação dos fungos de armazenamento; umidade relativa do ar em equilíbrio com a umidade da massa de grãos; temperatura da massa de grãos constante; baixo percentual de grãos danificados; remoção das impurezas acumuladas e manutenção da umidade relativa intergranular entre 65-70% e umidade dos grãos entre 13-14,5% (Lazzari, 1997; Programa...,1999; Eichelberger, 2000). O milho armazenado em espigas, com aeração natural, pode ser conservado com umidade entre 14 e 16,5% (Programa..., 1999).

O armazenamento a granel, em silos elevados, apresenta algumas vantagens, entre as quais se destacam a economicidade, pela menor necessidade de mão-de-obra e a eliminação do custo da sacaria, e a praticidade no uso da aeração, o que permite a conservação dos grãos por longos períodos sem perdas e alterações significativas na sua qualidade (Eichelberger, 2000).

O silo elevado de concreto possibilita a melhor qualidade de armazenagem, minimizando as perdas por deterioração de grãos, por insetos e por roedores. O silo elevado metálico, ou bateria de células metálicas, apresenta como principais vantagens a rapidez e o baixo custo de construção. Como desvantagens ressaltam-se a dificuldade do controle

fitossanitário e a possibilidade de condensação da umidade nas superfícies das paredes (Programa..., 1999).

Weber (1998) relata que pesquisadores chegaram à conclusão de que, no milho com umidade de 13% em base úmida, as moléculas de água estão fortemente ligadas à massa dos grãos pelas forças de Van der Walls, situação em que os fungos não as rompem; logo, sem água, não se desenvolvem e não sobrevivem.

2.9.2.1 Grau de umidade de grãos armazenados

Os fungos de armazenamento são adaptados para crescer em materiais com teores de umidade em equilíbrio com umidade relativa de 65-70% a 85-90%, que correspondem a teores de umidade de 13-20% em grãos de milho (Lazzari, 1997).

A umidade relativa do ar é um fator que controla o desenvolvimento de fungos em silos sem aeração. O teor de umidade dos grãos reflete a umidade relativa intergranular, mas, freqüentemente, de maneira não precisa, porque a umidade intergranular é afetada por vários fatores, como temperatura dos grãos, nível de contaminação, matérias estranhas, insetos, nível de oxigênio e condições físicas dos grãos (Moreno & Zamora, 1986).

Alguns fungos sobrevivem com baixos teores de umidade, porém, quando a umidade relativa do ar alcança 70-75%, a maioria dos materiais absorve água e em poucas horas se estabelecem as condições

para a germinação dos esporos do fungos de armazenamento. Quando a umidade intergranular alcança 75%, os fungos crescem interna e externamente nos grãos (Moreno & Zamora, 1986; Lazzari, 1997).

Os níveis mínimos de umidade necessários para o desenvolvimento das principais espécies de fungos *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. em grãos de milho armazenados são *A. restrictus* (13,5-14,5%), *A. glaucus* (14,0-14,5%), *A. candidus* (15,0-15,5%), *A. ochraceus* (15,0-15,5%), *A. flavus* (18,0-18,5%), *A. parasiticus* (18,0-19,0%), *Penicillium* spp.(15,5-19,0%) (Christensen & Kaufmann, 1974).

Para uma armazenagem segura, os grãos precisam ter teor de umidade inferior a 13,0% ou baixo o suficiente para que a umidade intergranular seja mantida entre 65-70%. Para uma armazenagem a longo prazo, é recomendável umidade intergranular de 65% e umidade entre 12,0 e 13,0% (Moreno & Zamora, 1986; Puzzi, 1989, Lazzari, 1997).

2.9.2.2 Temperatura dos grãos armazenados

Para Moreno & Zamora (1986), os grãos armazenados, como qualquer outro organismo vivo, podem manter-se dentro de certos limites de temperatura. A temperatura atmosférica, a temperatura do grão e a temperatura intergranular são considerados os fatores cruciais para a segurança e a prolongamento da qualidade dos grãos armazenados.

De acordo com Christensen & Kaufmann (1974), as temperaturas para o crescimento de alguns fungos de armazenamento em

grãos de milho diferem entre as espécies de um mesmo gênero. As faixas de temperaturas mínima, ótima e máxima para o desenvolvimento são: *A. restrictus* (5-10; 10-15; 40-45°C), *A. glaucus* (0-5; 30-35; 40-45°C), *A. candidus* (10-15; 40-50; 50-55°C), *A. flavus* (10-15; 30-35; 45-50°C), *A. ochraceus* (ótima = 15-25°C), *A. parasiticus* (ótima = 35-37°C) *Penicillium* spp.(-5-0; 20-25; 35-40°C).

Eichelberger (2000) destaca a temperatura ambiente como uma característica climática importante para o uso correto da aeração em silos de armazenagem de grãos, por que dela depende a temperatura dos grãos e do ar intergranular. Contudo, a temperatura da massa de grãos é mais importante porque atua sobre os processos químicos que alteram a qualidade dos grãos, na controle de insetos e infecção por fungos.

2.9.2.3 Aeração dos grãos armazenados

A aeração, definida como um sistema de ventilação mecânico, tem por principal finalidade resfriar e manter a massa de grãos a uma temperatura uniforme, assegurando a sua boa conservação (Mantovani & Fontes, 1989; Weber, 1998) e auxiliar na secagem (Eichelberger, 2000).

Na armazenagem, a aeração é fundamental para a manutenção de um ambiente controlado para a conservação de grãos sem perdas da qualidade nutricional e da matéria seca, devendo ser usada sempre que forem constatados pontos na massa de grãos com diferenças de temperaturas, iguais ou maiores de 6 °C, e sempre que for constatada uma

temperatura média igual ou superior a 6 °C em relação à temperatura ambiente (Weber, 1998).

De acordo com Lazzari(1997), a aeração uniformiza a temperatura da massa de grãos, evitando a transferência de umidade de uma porção de grãos para outra pela ação das microcorrentes de ar. Altas diferenças de temperatura dentro da massa de grãos causam o deslocamento do ar intergranular de um microambiente mais quente para outro frio, aumento o vapor d'água, que condensa e cria condições para a germinação e crescimento dos fungos.

2.10. Danos e perdas

2.10.1 Danos por microrganismos

Os fungos, durante o desenvolvimento, utilizam nutrientes contidos nos grãos, especialmente os do embrião; portanto, quanto mais tempo permanecerem as condições propícias para o desenvolvimento, maior será o dano aos nutrientes dos grãos. O embrião é caracterizado por possuir alto teor de gordura, conseqüentemente reduções nos valores energéticos de grãos contaminados são bastante prováveis. O consumo da matéria pelos fungos reduz a densidade do grão e o nível do valor energético (Vieira, 1995).

Bartov et al. (1982) detectaram a redução de 5% no valor de energia metabolizável em grãos infectados por fungos destinados à alimentação de frangos. A redução da matéria seca, para Lazzari (1997),

reflete-se no nível de nutrientes: um lote de milho com 5,0; 10,0 e 15,0% de grãos danificados por fungos pode ter de 100 a 150 kcal de energia/kg a menos que um lote com baixo percentual de grãos danificados por fungos.

Na América Central, as doenças causadas por *Diplodia* spp. têm provocado reduções médias no rendimento que variam de 19 a 27% (Padilla et al., 1990), mas que podem atingir até 100% em lavouras de monocultivo (Del Rio & Melara, 1991). López et al. (1990) quantificaram uma perda de 541 kg/ha, causada por *F. moniliforme* e *Diplodia* spp., que representou 25,8% de queda do rendimento para uma produção média de grãos de 2.093 kg/ha.

O ataque de fungos é uma das causas que acelera o processo de deterioração, produzindo grãos ardidos e mofados, conseqüentemente reduzindo o peso dos grãos. Um grão de milho ardido pesa menos da metade de um grão sadio do mesmo tamanho. Os danos por fungos de armazém em grãos de milho são a principal causa da redução na qualidade nutritiva, na classificação comercial e no preço do cereal e nos seus produtos, em razão da perda da palatabilidade e das propriedades nutricionais, pela presença de micotoxinas, as quais causam danos à saúde humana e animal (Christensen, 1980; Puzzi, 1989; Dowswell et al., 1996; Richardson & Bacon, 1995).

A infecção assintomática de grãos e sementes geralmente é ignorada, não causando danos visíveis, porém pode produzir micotoxinas

em grãos e ocasionar doenças como as podridões do colmo e murchas vasculares originadas de sementes infectadas (Munkvold & Desjardins, 1997) e ser responsáveis por danos, como enchimento reduzido dos grãos, acamamento de plantas e infecções de espigas e grãos (Foley, 1962).

2.10.2 Danos na colheita

Os danos mecânicos que ocorrem na colheita são aqueles relacionados à própria cultura e à colhedora. Dos fatores da cultura podem-se citar as características dos genótipos, a população de plantas, a fertilização, a ocorrência de plantas daninhas, de pássaros e insetos e o teor de umidade dos grãos na colheita. A colhedora pode danificar os grãos por causa da velocidade de deslocamento elevada, da velocidade angular, da posição do molinete, da regulagem, da velocidade do cilindro debulhador e da abertura do côncavo/cilindro, das peneiras e do ventilador. Os níveis de danos aceitáveis para a cultura de milho em condições normais são de 6%; acima de 10% representam um prejuízo superior ao custo operacional da colhedora (Marchesan & Costa, 1980; Mantovani, 1989).

Além dos danos mecânicos, a colheita deve ser avaliada através de fatores de campo, como perdas em espigas na pré-colheita e na plataforma e perdas de grãos soltos no espigador, no cilindro e na separação e de grãos no sabugo em razão dos mecanismos internos da colhedora. O nível de dano médio aceitável é próximo de 4% e serve

como indicador para a regulação da colhedora. Dessa forma, para uma produtividade média de 6 t/ha, significa um dano de quatro sacos de 60 kg/ha, cerca de US\$ 14,00/ha (Programa..., 1999).

Para uma produção de 28.281,1 milhões de toneladas de milho na safra 1993/94, foram detectados 17,07% de danos, que correspondem a 4.827,6 milhões de toneladas, equivalente à perda de US\$ 737.013.600. A maior concentração de danos ocorre na colheita, com 4,4%, e no armazenamento, com 7,8%. As causas principais dos danos foram o retardamento da colheita, o tempo prolongado do produto na lavoura, o tratamento pós-colheita inadequado ou ausente, a falha na colheita mecânica (máquina e operadores), a insuficiência de estrutura de secagem (Mantovani, 1989) e a localização inadequada da rede de armazenagem (Weber, 1998).

2.10.3 Danos no armazenamento

O armazenamento inadequado favorece a perda de matéria seca da massa de grãos de milho, causada por reações químicas dos constituintes orgânicos, como carboidratos, lipídios, proteínas e enzimas, pelo processo de oxidação com o oxigênio do ar, denominado de quebra técnica. Essas reações produzem dióxido de carbono, água e calor. A característica porosa dos grãos facilita os processos oxidativos (Weber, 1998).

Vários fatores, especialmente físicos e biológicos, inter-relacionados, podem contribuir para que o processo de deterioração do milho se instale e se acentue sempre que o tegumento for rompido, a umidade for superior a 14,0% e a temperatura estiver acima de 18 °C. Um armazém de milho é um sistema ecológico artificial no qual os organismos vivos mais importantes são os grãos (Moreno & Zamora, 1986, Mantovani & Fontes, 1989).

CAPÍTULO III

EFEITO DO RETARDAMENTO DA COLHEITA NA OCORRÊNCIA DE FUNGOS PATOGÊNICOS, DE GRÃOS ARDIDOS E DE MICOTOXINAS

3.1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.), em função de seu potencial produtivo, composição química e valor nutritivo, constitui-se em um dos mais importantes cereais cultivados no mundo. Em razão de sua multiplicidade de aplicações, quer na alimentação humana, quer na alimentação animal, assume papel socioeconômico relevante, além de constituir-se em matéria-prima indispensável e impulsionadora de complexos industriais diversificados (Dowswell et al., 1996; Reis & Casa, 1996; Dourado Neto & Fancelli, 2000).

Entre as doenças que interferem na produtividade e na qualidade comercial e nutritiva do produto colhido, destacam-se as podridões de espigas (PE), as quais são associadas à incidência de grãos ardidos (GA). Estes se caracterizam pela presença de sintomas e sinais de fungos, os quais, somados a infecções assintomáticas, podem produzir

micotoxinas, que são metabólitos tóxicos ao homem e aos animais (Munkvold et al., 1997; Dhingra & Coelho Neto, 1998).

A elevação da ocorrência e da severidade de doenças na cultura do milho, em muitos casos, torna-se fator limitante à produtividade de grãos. Normalmente, a intensidade das PE é superior quando se pratica a monocultura aliada ao plantio direto. As PE causam danos consideráveis em áreas de clima úmido, especialmente quando ocorre precipitação pluvial acima da normal próximo à época de colheita (Flett & Wehner, 1992; Reis & Casa, 1996; Pereira, 1997).

Os principais patógenos causadores de podridões de espigas, segundo Headrick & Pataky (1991), são *Diplodia* (= *Stenocarpella*) *maydis* (Berk.) Sacc., *D. macrospora* Earle, *Fusarium moniliforme* (Sheld.) (*Giberrella fugikuroi* Sawada), *F. graminearum* Schwabe (*G. zaeae* Schwein). Outras espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Nigrospora*, *Penicillium* e *Trichoderma* também interferem na produtividade de grãos, por causa das doenças da PE (Kommedahl & Windels, 1981; McGee, 1988; Smith & White, 1988).

Asevedo et al. (1994) pesquisaram noventa amostras de grãos de milho provenientes de várias regiões do Brasil e verificaram que os fungos mais prevalentes em grãos com teores de umidade entre 12 e 18,8% foram os dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Do gênero *Aspergillus*, a espécie *A. flavus* foi a mais freqüente, sendo isolada em 36,6% das amostras.

Wicklowsky & Donahue (1984), Wicklowsky & Horn (1984) e Fonseca (1999) relataram que o *A. flavus* produz escleródios esporogênicos os quais estão presentes no grão de milho infectado. O

papel desses escleródios na epidemiologia do fungo não é bem conhecido.

Segundo Salgado & Carvalho (1980), os fungos mais freqüentes no milho procedente de várias regiões brasileiras foram *F. moniliforme* e *F. graminearum*. Lillehøj & Zuber (1988) analisaram a microbiota de milho recém-colhido proveniente de oito países, inclusive do Brasil. Os resultados revelaram que, em 92% das amostras, detectou-se *Fusarium* quando os isolamentos foram feitos à temperatura de 26 °C e 100% a 15 °C.

O crescimento de fungos patogênicos nos grãos de milho pode resultar em perdas nutritivas por causa da degradação de nutrientes, consumo de energia bruta, consumo de matéria seca e, o principal fator a considerar, a possibilidade de fungos toxigênicos se desenvolverem e produzirem micotoxinas, que são nocivas ao homem e aos animais domésticos (Puzzi, 1989; Lazzari, 1997; Mallozzi & Corrêa, 1998).

As principais micotoxinas encontradas no milho dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são as aflatoxinas e a ocratoxina; do gênero *Fusarium* são o deoxinivalenol, as fumonisinas, o nivalenol, a toxina T-2 e a zearalenona (Miller, 1995). Todas são de ocorrência freqüente nos estados do sul do Brasil - Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul - e as mais importantes para a agricultura mundial (Fonseca, 1999).

As aflatoxinas constituem um grupo de metabólitos secundários tóxicos que podem ser produzidas por algumas espécies do grupo de *Aspergillus flavus* Link ex Fries e da espécie *A. parasiticus* Speare. Deste grupo de metabólitos os quatro principais são as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ por serem altamente tóxicas, sendo a

aflatoxina B1 considerada o carcinógeno natural mais potente para o homem (Heathcote, 1984; Payne, 1983).

As podridões de espigas de milho são provocadas por um grupo de fungos dos quais os mais importantes são *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *D. maydis*, *Colletotrichum graminicola*, *Penicillium spp.* e *A. flavus* e *A. parasiticus*. Tais fungos causam danos na planta e nos grãos, especialmente no final do ciclo, por causa do apodrecimento das espigas, da redução no peso de grãos e da contaminação por micotoxinas. Esses danos podem ser minimizados se a colheita da lavoura de milho for realizada tão logo a umidade dos grãos ofereça condições (Puzzi, 1989; Lazzari, 1997).

A colheita pode ser iniciada a partir da maturação fisiológica do grão, que ocorre com a umidade entre 40 e 30%. Nessa faixa de umidade, aparece nos grãos uma camada preta no ponto de inserção do grão com o sabugo, que separa o grão da planta, a partir do que os grãos têm vida independente. Porém, a umidade dos grãos mais indicada para colheita se situa abaixo de 26% (Mantovani, 1989; Eichelberger, 2000).

O presente trabalho teve por objetivos identificar o efeito do retardamento da colheita na incidência dos grãos ardidos e de patógenos envolvidos com as podridões de espigas e com a contaminação por micotoxinas. Tais objetivos foram estabelecidos mediante a hipótese de que o retardamento da colheita influenciam na incidência de grãos ardidos (GA) e de patógenos envolvidos com as doenças de espigas e na contaminação por micotoxinas.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Local e época

O experimento de campo foi executado na lavoura experimental da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo - RS.

As avaliações e determinações foram realizadas no Laboratório de Fitopatologia do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, no Laboratório de Análises de Micotoxinas do Centro de Pesquisa em Alimentação da UPF e no Laboratório de Microbiologia Fitopatológica do Departamento de Fitossanidade de Faculdade de Agronomia de UFRGS, no período compreendido de outubro de 1998 e julho de 1999.

3.2.2 Experimento de campo

O experimento com o milho híbrido XL 212, na safra 98/99, foi conduzido em uma área de um hectare de lavoura, com 5,8 sementes por metro e espaçamento de 0,90m entrelinhas. O cultivo foi conduzido sob o sistema plantio direto com rotação de culturas: soja/nabo/milho híbrido XL 212.

3.2.3 Amostragem de grãos

A amostragem dos grãos foi realizada conforme Reis et al. (1998), que emprega o critério da escolha aleatória simples de cinco pontos distribuídos eqüidistantes dentro da área de avaliação. Foram colhidas todas as espigas das plantas de milho de uma linha de dez metros, que constituindo uma subamostra.

Foram coletadas nove amostras, que representaram nove tratamentos, sendo que a primeira ocorreu quando os grãos apresentavam 38% de umidade e a nona e última, cerca de sessenta dias após o início das avaliações. As amostras foram realizadas a intervalos de sete dias

As espigas foram colhidas, despalhadas manualmente e debulhadas com trilhadeira no laboratório. O volume de cerca 6 kg de grãos de cada subamostra foi acondicionado em sacos de plásticos com capacidade para 10kg. Após o processamento, as cinco subamostras foram misturadas e homogeneizadas. O volume total obtido constituiu a amostra da coleta ou tratamento, que totalizou cerca de 28 kg de grãos.

3.2.4. Determinação da umidade dos grãos

A umidade dos grãos foi determinada com medidor de umidade portátil marca Multi-Grain, modelo 46233-12, série 1233-10542, manufaturado por Dickey - John Corporation - Auburn, Illinois - EUA.

3.2.5 Incidência de grãos ardidos

Conforme Brasil (1996), o critério usado para a determinação de incidência de GA consiste na separação visual dos grãos com sintomas de descoloração em mais de um quarto da superfície total do grão, causada pela infecção por fungos, a partir de uma subamostra de 250 g de grãos. Utilizaram-se quatro repetições de 250g de grãos de cada tratamento. A média dos resultados foi transformada em porcentagem, que corresponde à incidência de grãos ardidos na amostra.

3.2.6 Incidência de fungos patogênicos

Foi utilizada uma subamostra laboratorial de cada tratamento proveniente da coleta. Os grãos foram desinfestados com álcool a 70% por dois minutos; em seguida, com hipoclorito de sódio a 2%, durante dois minutos, e, posteriormente, enxaguados, duas vezes, em água destilada e esterilizada.

As incidências de fungos associados aos grãos foram obtidas a partir de quatro subamostras (repetições) de cem grãos (Brasil, 1992).

Os grãos foram plaqueados em placas de petri contendo o meio de cultura um quarto de BSA (50 g de batata, 5 g de sacarose, 20 g ágar e 500 ppm de sulfato de estreptomicina). Foram empregadas quatro repetições de vinte placas petri com cinco grãos cada e incubadas em câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas, por cinco a sete dias. Após, com auxílio de lupa estereoscópica e microscópio ótico, procedeu-se à identificação dos fungos.

Os resultados foram expressos em incidência de fungos, resultante da média aritmética das quatro repetições. A média de incidência obtida em números absolutos foi convertida em valor relativo.

3.2.7 Análise de micotoxinas

O método utilizado para a determinação das micotoxinas foi cromatografia em camada delgada. A preparação de solução de estoque dos padrões e a determinação exata da concentração seguiram a metodologia descrita no item 971.22 (Scott apud AOAC, 1997). Os processos de extração, clarificação e concentração do estrato seguiram a

metodologia desenvolvida por Soares (1987); para determinação simultânea das micotoxinas aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, ocratoxina A, zearalenona e esterigmatocistina, utilizou-se a metodologia oficial da AOAC (1997), itens 982.24, 982.25 e 982.26.

Realizou-se a triagem das micotoxinas em todas as amostras. Após, as amostras que apresentaram resultados positivos foram submetidas à confirmação por cromatografia em camada delgada bidirecional. A quantificação foi realizada por comparação visual da intensidade de fluorescência da mancha do analito da amostra com a fluorescência da mancha das alíquotas dos padrões recomendados pelo método (Patterson & Roberts, 1979).

Os limites de detecção do método para a quantificação das amostras foram: aflatoxinas - B₁: 3 (µg/kg); B₂: 2 (µg/kg); G₁: 3 (µg/kg) e G₂: 2 (µg/kg), zearalenona: 527,04 (µg/kg), ocratoxina A: 76,48 (µg/kg), esterigmatocistina: 84,8 (µg/kg).

Foi utilizada a metodologia de Scott (1991) para confirmar as aflatoxinas B₁ e G₁. Para a confirmação de ocratoxina A e zearalenona foi aplicada a metodologia de Golinski & Grabarkiewicz-Szczena (apud AOAC, 1997). A confirmação da esterigmatocistina seguiu a metodologia oficial da AOAC (1997), item 973.38.

As análises de micotoxinas em extratos de grãos de milho, pelo método de cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando-se cromatofolhas de alumínio para a cromatografia em camada delgada com camada de silicagel 60, 20 x 20. Os padrões de aflatoxinas B₁ (A 6636),

B₂ (A9026), G₁ (A0138), G₂ (A9151); ocratoxina A (O1877); esterigmatocistina (S3255) e zearalenona (Z2126).

As concentrações das soluções padrões de trabalho foram: aflatoxinas [B₁ (0,5(g/g)), [B₂ 0,1(g/g)], [G₁ 0,5(g/g)] e [G₂ 0,1(g/g)]; ocratoxina A [4,79(g/g)]; zearalenona [54,9(g/g)]; e esterigmatocistina [5,3(g/g)].

Todos os reagentes utilizados foram p. a..

3.2.8 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi o completamente casualizado (DCC). Os tratamentos foram constituídos pelo volume de grãos do híbrido XL 212, da amostra coletada no experimento de campo. Foram obtidos nove tratamentos (coletas) com quatro repetições para cada determinação e avaliação.

Os resultados foram submetidos à técnica de análise de variância simples a 5% de probabilidade, pelo teste F de significância e análise de regressão polinomial.

Utilizou-se o programa computacional (Sistema de Análise de Variância - versão 3.02) - SISVAR.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Incidência de patógenos e de grãos ardidos

A identificação dos patógenos causadores das PE de milho possibilitou traçar um perfil da influência do grau de umidade (GU) do

milho maduro e do retardamento da colheita na incidência de fungos patogênicos e de grãos ardidos (GA) (Figura 1).

A incidência mais elevada dos patógenos identificados no início das avaliações, quando os grãos apresentaram grau de umidade acima de 22%, foi da espécie de *F. moniliforme* (Fumon). A incidência desse fungo foi se reduzindo à medida que os grãos perderam água; as demais espécies identificadas apresentaram incremento de incidência com a redução da umidade dos grãos.

Nas duas primeiras avaliações, com teor de umidade de 38,0% e 33,0%, foram detectados, respectivamente, 61 e 64% de incidência de *Fusarium moniliforme*, porém não foram detectados GA. É provável que esses resultados tenham relação com infecção sistêmica recente dos grãos pelo *F. moniliforme*. Isso está de acordo com os relatos de Munkvold et al. (1997), que destacaram ser a colonização via sistêmica assintomática e comum com esse fungo.

A incidência de 0,6% de GA foi detectada a partir da terceira avaliação, quando os grãos apresentaram 28% de umidade. Nesta avaliação, a incidência de *F. moniliforme* apresentou uma redução de 8% em relação à segunda. A incidência dos grãos ardidos foi associada a um período mais longo, cerca 15 dias, de exposição dos grãos aos patógenos sistêmicos, como também à colonização dos grãos pelos fungos que penetraram via estigma, o que permitiu o desenvolvimento dos fungos.

A incidência de 4,0% de GA na última coleta, pode ter sido resultado das colonizações das espécies de patógenos que infectaram os grãos via estigma. A ocorrência do processo infeccioso e as colonizações via estigmas pós-polinização é fator determinante na percentagem de

grãos colonizados e no aparecimento ou não dos sintomas, segundo Styer & Cantliffe (1989).

O fungo *F. moniliforme* apresentou incidência mais elevada na maturação fisiológica dos grãos, quando estes apresentavam grau de umidade elevado, no entanto se manteve alta até ao final das avaliações. Esse resultado pode estar relacionado com a condição de umidade dos grãos e no interior da espiga, possivelmente em razão do molhamento por chuvas, embora tenha ocorrido uma redução de incidência de cerca de 50% durante o período de avaliações.

Durante esse período das avaliações, o milho permaneceu na lavoura, exposto ao ataque de insetos, fungos e ao umedecimento pelas chuvas. A perda da umidade pelos grãos em ambiente de lavoura, provavelmente, propiciou condições para o crescimento dos fungos das espécies *Aspergillus* (Aspspp), *Penicillium* (Penspp) e *Cephalosporium* (Cephsp).

As incidências das espécies de *Aspergillus* spp., *Diplodia* (Diplsp), *Fusarium graminearum* (Fugra) e *Penicillium* spp. foram ausentes ou baixas nas três avaliações iniciais. O incremento na incidência ocorreu à medida que os grãos ficaram sujeito ao permanência na lavoura. Estes resultados podem indicar a competição pelo ambiente e pelo substrato, que apresentava redução do grau de umidade e com a espécie *F. moniliforme*, cuja incidência foi se reduzindo ao longo da avaliações.

Os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são patógenos que não possuem capacidade para colonizar tecidos vegetais fisiologicamente ativos (Agarwal & Sinclair, 1997). Essa característica

pode ser interpretada como condizente com os resultados obtidos, nas avaliações realizadas ao longo do trabalho, visto que a sua incidência foi mais elevada quando os grãos apresentaram umidade reduzida.

As espécies do gênero *Cephalosporium* apresentaram incidência de 5,5% na primeira coleta e passaram para 36,2% na terceira coleta, mantendo a elevação da incidência até a última avaliação, quando alcançaram 60,5%. Esses resultados estão de acordo com a incidência de 31,76% detectada por Trento (2000) em grãos com umidade na faixa de 20,0%.

A incidência das espécies de *Cephalosporium* spp. pode ter relação com a redução do grau de umidade dos grãos. Por outro lado, seu incremento de incidência ocorreu à medida que a espécie *F. graminearum* e os gêneros *Aspergillus*, *Diplodia* e *Penicillium* também revelaram elevação de incidência. Observou-se também que, nesse mesmo intervalo de avaliações, houve redução da incidência do *F. moniliforme*. Não há relatos na literatura que discutam esses fatos. A ocorrência de incidências de *Cephalosporium* spp. em milho são relatadas por Koheler (1942), Ueno (1983), Snyder (1986), Shurtleff (1992) e Pinto (1998), porém os autores não estabeleceram relações com doenças de espigas por *Cephalosporium*; o fungo é apenas citado, como habitante natural do solo, necrotrófico e produtor de tricotecenos.

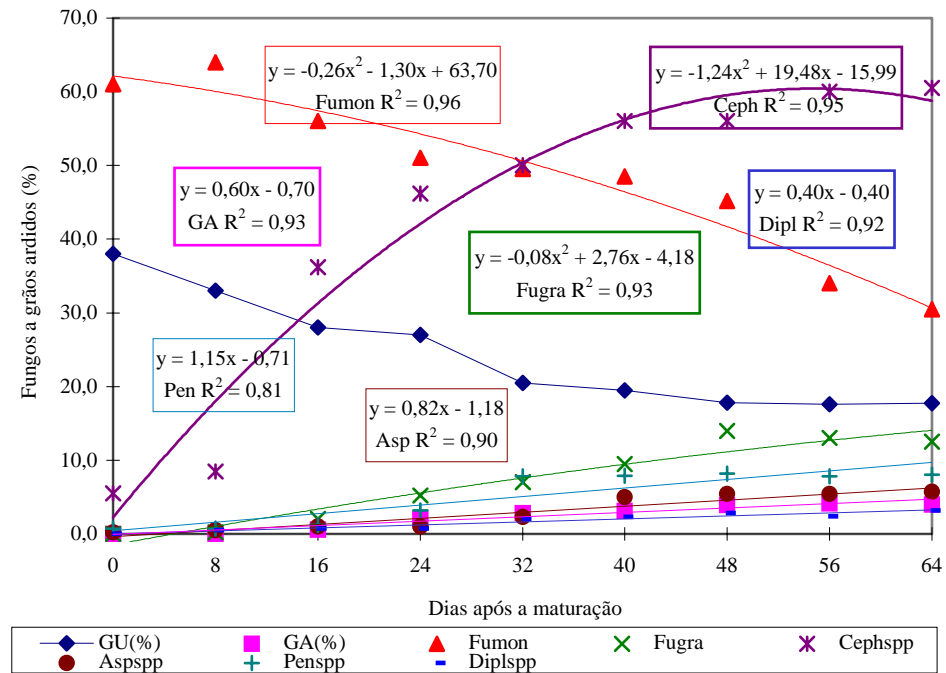


FIGURA 1- Relação entre dias após a maturação dos grãos de milho e a incidência (%) de fungos patogênicos e de grãos ardidos durante o período de retardamento da colheita.

A elevação da incidência do *Cephalosporium* à medida que os grãos perderam umidade pode indicar preferência por colonizar substratos com reduzida umidade e baixa atividade fisiológica. Essas características são similares às das espécies de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., denominados fungos de armazenamento.

Outras espécies de fungos, como *Nigrospora* spp. e *Trichoderma* spp., também agentes causais de PE e dos GA, foram detectadas, porém com incidência reduzida.

A ocorrência dos patógenos detectada neste trabalho foi semelhante à incidência obtida por Trento (2000), que avaliou grãos de milho das safras 97/98 e 98/99 e identificou as seguintes espécies e gêneros de patógenos, relacionados em ordem decrescente de incidência: *F. moniliforme*, *Cephalosporium* spp., *Diplodia* spp., *Penicillium* spp.,

Aspergillus spp., *Fusarium graminearum*, *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp., *Colletotrichum graminicola* e *Nigrospora* spp.

3.3.2 Contaminação por micotoxinas

Os resultados da Figura 1 demonstram que os fungos toxigênicos dos gêneros *Aspergillus*, *Diplodia*, *Cephalosporium* e *Penicillium* e a espécie *F. graminearum* revelaram elevação na incidência à medida que houve o retardamento da colheita dos grãos. A senescência da planta de milho, a baixa atividade fisiológica e a diminuição da atividade água dos grãos pareceram estabelecer as condições adequadas para o crescimento desses fungos, originando a infecção, a colonização, a possível redução de peso e a contaminação por micotoxinas. Esses resultados podem estar relacionados com a presença de micotoxinas ao final das avaliações. Na época recomendada para a colheita (20 - 25% de umidade) não houve contaminação com micotoxinas. A permanência na lavoura caracterizou retardamento de colheita e foi de aproximadamente de 30 dias no período avaliado.

Os resultados da Tabela 1 mostram a relação da variação da umidade dos grãos fisiologicamente maduros que permaneceram na lavoura e a contaminação por micotoxinas por fungos toxigênicos. Esses resultados podem ser relacionados com o retardamento da colheita, que favoreceu a formação da micotoxina zearalenona (878,4 ppb), produzida por fungos do gênero *Fusarium*. Fonseca (1999) destaca que a zearalenona pode ser encontrada no milho antes da colheita, quando o clima é úmido e frio, depois da emissão dos estigmas e também durante o armazenamento.

TABELA 1. Relação do retardamento da colheita de grãos de milho com a contaminação por micotoxinas.

Micotoxinas (ppb)	Dias de retardamento da colheita do milho								
	0	8	16	24	32	40	48	56	64
Aflatoxinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esterigmatocistina	-	-	-	-	-	-	-	-	50,9
Ocratoxina A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Zearalenona	-	-	-	-	-	-	-	-	878,4

A contaminação por esterigmatocistina, 50,8 ppb, produzida pelos fungos do gênero *Aspergillus*, confirmou os relatos de Vesender & Horn (1985) e de Mills & Abramson (1986), que detectaram essa micotoxina em grãos de cereais provenientes na lavoura.

A contaminação por micotoxinas pode estar influenciada pelo retardamento da colheita de grãos, o que possivelmente favoreceu a elevação da incidência dos fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cephalosporium*.

3.4. CONCLUSÕES

A incidência de fungos e a produção de micotoxinas em grãos de milho maduros durante a permanência na lavoura foram influenciadas pelo retardamento da colheita.

A incidência de grãos ardidos e de *Fusarium moniliforme* foi relacionada com o grau de umidade e o retardamento da colheita.

A incidência de *Aspergillus* spp., *Cephalosporium* spp., *Diplodia* spp., *F. graminearum* e *Penicillium* spp. elevou-se a partir da redução da incidência de *F. moniliforme* e/ou pelo retardamento da colheita.

CAPÍTULO IV

EFEITO DO RETARDAMENTO DA COLHEITA E DE COBERTURA VERDE DO SOLO NA OCORRÊNCIA DE GRÃOS ARDIDOS E DE FUNGOS PATOGÊNICOS NO MILHO

4.1. INTRODUÇÃO

O manejo da cultura do milho visando à prevenção e à redução dos danos causados pelas podridões de espigas envolve medidas de caráter cultural, ambiental e biológico. Essas incluem redução do estresse das plantas pela seca, época de semeadura, colheita com umidade adequada, utilização correta de equipamentos de colheita, uso de genótipos tolerantes, fertilização equilibrada, tratamento de sementes, controle de plantas daninhas, uso de população de plantas adequada, rotação de culturas e cobertura verde de solo (Dourado Neto & Fancelli, 2000).

A importância econômica do milho é evidenciada pelo volume e pelo valor de sua produção e participação na cadeia produtiva da economia primária e do agronegócio. Esse cereal é o principal alimento de milhões de pessoas, fornecendo 15% das proteínas e 19% das calorias produzidas anualmente no mundo (Pandey & Knapp, 1992; Dowsell et al., 1996).

A aveia preta (*Avena strigosa* Schreb, cvs. aveia preta comum, Iapar 61 e Embrapa 29 - Garoa) é a gramínea de inverno mais utilizada como cultura de cobertura verde/morta do solo em todo o sul do Brasil. O nabo forrageiro, (*Raphanus sativus* L.), também é usado como cobertura verde de solo, destacou-se por apresentar rápido crescimento, baixo custo das sementes, alto rendimento de massa verde e baixa relação C/N, que facilita a reciclagem dos nutrientes (Floss, 2000).

Como regra, os fungos agentes causais das podridões do colmo são também responsáveis pelas podridões de espigas, como *Cephalosporium* spp., *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G.W. Wils., *Diplodia macrospora* Earle, *D. maydis* (Berk.) Sacc., *Fusarium graminearum* (Schwabe), *F. moniliforme* J. Sheld. e *F. subglutinans* (Wollenweb. & Reink.) P. E. Nelson, T. A. Toussoun, & Marasas, além de outros de importância secundária como *Nigrospora oryzae* (Berk & Br.) Petch., *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp (McGee, 1988; Smith & White, 1988; Luz, 1995; Reis & Casa, 1999).

As podridões de espigas (PE) envolvem o ataque direto dos fungos aos grãos que exibem sintomas da colonização. Os grãos com essa sintomatologia são denominados de grãos ardidos (GA) (Reis & Casa, 1996) e podem conter micotoxinas, acarretando a redução de fornecimento de energia para a alimentação animal, além da possibilidade de causarem micotoxicoses em animais domésticos (Molin, 1999). Segundo Pacheco et al. (1997), quanto mais tempo o milho

permanecer na lavoura após a maturidade fisiológica, mais sujeito ficará à infecção por fungos de campo.

No milho, a maturação fisiológica caracteriza-se pela formação de uma camada preta no ponto de inserção do grão no sabugo que interrompe sua conexão nutricional com a planta e, por essa razão, o grão não mais acumula matéria seca. Essa etapa ocorre quando os grãos apresentam umidade entre 38 e 30% e têm seu peso máximo (Eichelberger, 2000).

De acordo com Mantovani (1989) e Programa... (1999), o conhecimento da curva de secagem de cada cultura no campo, híbrido ou variedade, que é dependente do seu ciclo, das condições climáticas e da época de plantio, favorece o sucesso da colheita, que depois da implantação bem-sucedida da lavoura, é a operação mais importante do ciclo produtivo. Recomendam a realização da colheita mecânica quando a umidade dos grãos é de 18 a 25%.

O presente trabalho foi executado com o objetivo de caracterizar o efeito do retardamento da colheita e da cobertura verde de solo na incidência de GA e de fungos patogênicos em grãos dos híbridos de milho XL 212 e XL 344.

O objetivo foi estabelecido mediante a hipótese de que a incidência de grãos ardidos e de fungos patogênicos em grãos de milho pode ter relação com a cobertura verde do solo e com o retardamento da colheita do milho.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Local e época

Os experimentos foram executados na lavoura experimental e no Laboratório de Fitopatologia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (UPF), em Passo Fundo - RS.

As avaliações e determinações foram realizadas no Laboratório de Fitopatologia do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da UPF e no Laboratório de Microbiologia Fitopatológica do Departamento de Fitossanidade de Faculdade de Agronomia de UFRGS, no período compreendido entre outubro de 1998 e julho de 2000.

4.2.2 Experimento de campo

Na safra de 99/2000, foram cultivadas, pelo sistema de semeadura direta, duas áreas de 60 m x 100 m com híbridos XL 344 e XL 212, ambos da Braskalb; cada área possuía 5,8 plantas por metro, com espaçamento entrelinhas de 0,9 m. Cada híbrido foi semeado sobre dois tipos de cobertura, aveia preta e nabo forrageiro.

4.2.3 Amostragem de grãos

A amostragem dos grãos foi realizada conforme Reis et al. (1998), que empregam o critério da escolha aleatória simples de cinco pontos distribuídos eqüidistantes dentro da área de avaliação. Foram colhidas todas as espigas das plantas de milho de uma fila de dez metros.

Foram coletadas sete amostras, que representaram sete tratamentos, sendo que a primeira ocorreu quando os grãos apresentavam 38% de umidade e a sétima e última, cerca de sessenta dias após o início das avaliações. As coletas foram realizadas a intervalos de 9 dias. Após o processamento das amostras foi determinada a umidade dos grãos de todas as coletas.

As espigas foram colhidas, despalhadas manualmente e debulhadas com trilhadeira no laboratório. O volume de cerca 6kg de grãos de cada subamostra foi acondicionado em sacos de plásticos com capacidade para 10kg. Após o processamento, as cinco subamostras foram misturadas e homogeneizadas. O volume total obtido constituiu a amostra da coleta ou o tratamento, que totalizou cerca de 28 kg de grãos.

4.2.4 Determinação da umidade dos grãos

A umidade dos grãos foi determinada com medidor de umidade portátil marca Multi-Grain, modelo 46233-12, série 1233-10542, manufaturado por Dickey - John Corporation - Auburn, Yllinois, EUA.

4.2.5 Incidência de grãos ardidos

Conforme Brasil (1996), o critério consiste na separação visual dos grãos com sintomas de descoloração em mais de um quarto da sua superfície total, causada pela infecção por fungos, a partir de uma amostra de 250 g de grãos por amostra. Neste trabalho, utilizaram-se quatro repetições de 250 g de grãos de cada amostra.

O valor da média dos resultados foi transformado em porcentagem, que corresponde à incidência de grãos ardidos na amostra.

4.2.6 Incidência de fungos patogênicos

Foi utilizada uma subamostra laboratorial de cada amostra proveniente das coletas. Os grãos foram desinfestados com álcool a 70% por dois minutos; em seguida, com hipoclorito de sódio a 2%, durante dois minutos, e, posteriormente, enxaguados duas vezes em água destilada e esterilizada.

As incidências de fungos associados aos grãos foram obtidas a partir de uma amostra composta de quatro subamostras (repetições) de cem grãos (Brasil, 1992).

Os grãos foram plaqueados em placas de petri contendo o meio de cultura um quarto de BSA (50 g de batata, 5 g de sacarose, 20 g ágar e 500 ppm de sulfato de estreptomicina).

Os grãos das quatro subamostras foram plaqueados num arranjo experimental de quatro repetições de vinte placas com cinco grãos e incubados em câmara de crescimento à temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de doze horas, por cinco a sete dias. Após, com auxílio de lupa estereoscópica e microscópio ótico, procedeu-se à identificação dos fungos.

Os resultados foram expressos em incidência média de fungos, resultante da média aritmética das quatro repetições. As médias de incidência obtidas em números absolutos foram convertidas em valores relativos.

4.2.7 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi o completamente casualizado (DCC). Os tratamentos foram constituídos pelo volume de grãos, dos híbridos XL 212 e XL 344, das amostras coletadas nos experimentos de campo. Foram obtidos sete tratamentos (coletas) com quatro repetições da unidade experimental para cada determinação e avaliação realizadas.

Os resultados foram submetidos à técnica de análise variância univariada a 5% de probabilidade pelo teste F de significância e análise de regressão polinomial.

Utilizou-se o programa computacional (Sistema de Análise de Variância - versão 3.02 - SISVAR).

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Incidência de grãos ardidos

O milho híbrido XL 344, cultivado sobre a cobertura de nabo, apresentou incidência mais elevada de grãos ardidos (GA), alcançando o máximo de 6,20%, entre a quarta e a quinta avaliações (Figura 1). Quando cultivado sobre a cobertura de aveia apresentou incidência máxima de 3,50%, também entre a quarta e quinta avaliações. Esse resultado pode ser relacionado com a dinâmica da liberação do nitrogênio no solo pela cobertura verde, visto que, segundo Heinzmann (1985), o nabo libera o nitrogênio rapidamente no solo, ao passo que a aveia mantém a liberação até o estágio de florescimento e enchimento

dos grãos. Dessa forma, a aveia pode suprir a necessidade do nitrogênio de forma mais equilibrada que o nabo, reduzindo, conseqüentemente, a possibilidade de ação dos patógenos

As incidências mais elevadas de GA, de todos os tratamentos, ocorreram na terceira, quarta e quinta avaliações. Esses resultados foram detectados no intervalo do grau de umidade médio dos grãos entre 25,1 a 16,2%, que coincide com a faixa de umidade recomendada para a realização da colheita do milho, conforme Programa...(1999) e Eichelberger (2000).

Em resposta à variação do grau de umidade, mostrada na Tabela 1, a evolução dos sintomas de colonização pelos fungos ocorreu enquanto os grãos apresentavam teores de umidade elevados, acima de 20,0% (Figura 1), que coincide com o intervalo de umidade recomendado pela literatura para realização de colheita mecânica. Abaixo desse grau de umidade nos grãos, não foram observados novos sintomas de doenças de espigas que caracterizassem GA.

TABELA 1. Graus de umidade (%) dos grãos nas sete coletas a intervalos de nove dias dos híbridos XL 212 e XL 344 cultivados sobre as coberturas verdes do solo nabo forrageiro e aveia preta. Safra 99/00.

		Coletas de grãos de milho						
Híbridos	Cobertura	1	2	3	4	5	6	7
XL 212	Aveia	37,0	32,0	26,0	19,0	16,7	14,6	13,0
XL 212	Nabo	38,0	32,0	25,4	19,0	16,0	15,5	13,0
XL 344	Aveia	38,0	33,0	25,0	18,0	16,7	14,8	13,4
XL 344	Nabo	37,0	32,0	24,0	18,6	15,6	15,0	14,0

O híbrido XL 212 revelou, incidências máximas de 2,30% e 2,00%, sobre coberturas de aveia e nabo, respectivamente. A incidência de GA não apresentou diferença significativa entre as coberturas verdes. Esses resultados podem estar relacionados à adaptação do cultivar ao solo e ao clima do experimento. Outro aspecto especulado foi o fator genético, que pode ter influenciado na incidência de GA. Os resultados assemelham-se aos obtidos por Trento (2000), na safra 98/99, que detectou a incidência de 3,51% de GA em grãos com umidade de 20%.

Observou-se que os dois híbridos usados neste experimento apresentaram comportamentos diferentes em relação à incidência de GA. Características genéticas dos híbridos e condições ambientais podem ter influenciado na ocorrência dos GA.

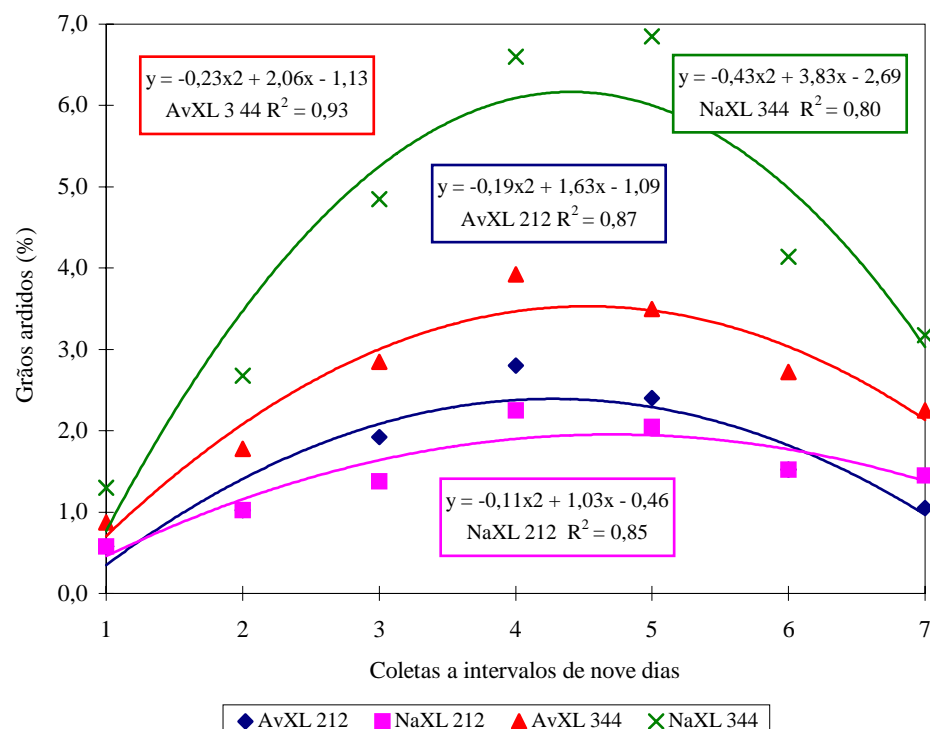


FIGURA 1- Incidência de grãos ardidos (GA) em grãos de milho maduros dos híbridos XL 212 e XL 344, em sete coletas com diferentes graus de umidade, após a maturação fisiológica, durante o retardamento da colheita, e cultivados sobre

cobertura verde de solo (Av = aveia preta e Na = nabo forrageiro). Safra 99/00.

Os resultados recomendam a antecipação de colheita para mais próximo da maturação fisiológica, embora isso seja viável quando se colhe em espiga, especialmente na produção de sementes, que são secadas na espiga e depois debulhadas.

Nas avaliações finais, quando se caracterizou retardamento da colheita, após a quarta avaliação, quando os grãos apresentaram grau de umidade abaixo de 16,0%, as incidências de GA foram menores; dessa forma, não representaram a situação comum de ocorrência das doenças de PE e de GA.

A partir da redução do teor de umidade nos grãos para percentuais inferiores a 20,0% até alcançar a faixa de 14,0 a 13,0%, ocorreu a perda da massa seca dos GA com sintomas, o que resultou na redução da incidência.

4.3.2 Incidência de fungos patogênicos

4.3.2.1 Incidência de *Aspergillus* spp.

De acordo com a Figura 2, a incidência dos fungos *Aspergillus* spp. elevou-se à medida que os híbridos permaneceram na lavoura (R^2 superior a 0,82) e ocorreu a redução na umidade dos grãos (Tabela 1). Os valores dos resultados demonstraram que o gênero *Aspergillus* possui a capacidade de crescer em condições de baixa umidade nos substratos e apresentou crescimento a partir do momento em que os grãos entraram no estágio de maturação. Essa condição

revelou a preferência do fungo por substratos com baixa atividade fisiológica ou por causa da baixa atividade água.

A incidência mais elevada de *Aspergillus* spp. foi de 2,5%, detectada no híbrido XL 212 cultivado sobre aveia. Esse resultado, embora seja o mais elevado, não foi significativamente diferentes dos demais tratamentos. As incidências das espécies de fungos *Aspergillus* spp. devem ser consideradas uma fonte potencial de inóculo para os grãos armazenados por serem considerados fungos de armazenamento. De acordo com Reis & Casa (1999), no processo de mistura de lotes infectados com outros não infectados procede-se, automaticamente, à inoculação dos patógenos, prejudicando a qualidade e o valor comercial de toda a massa de grãos.

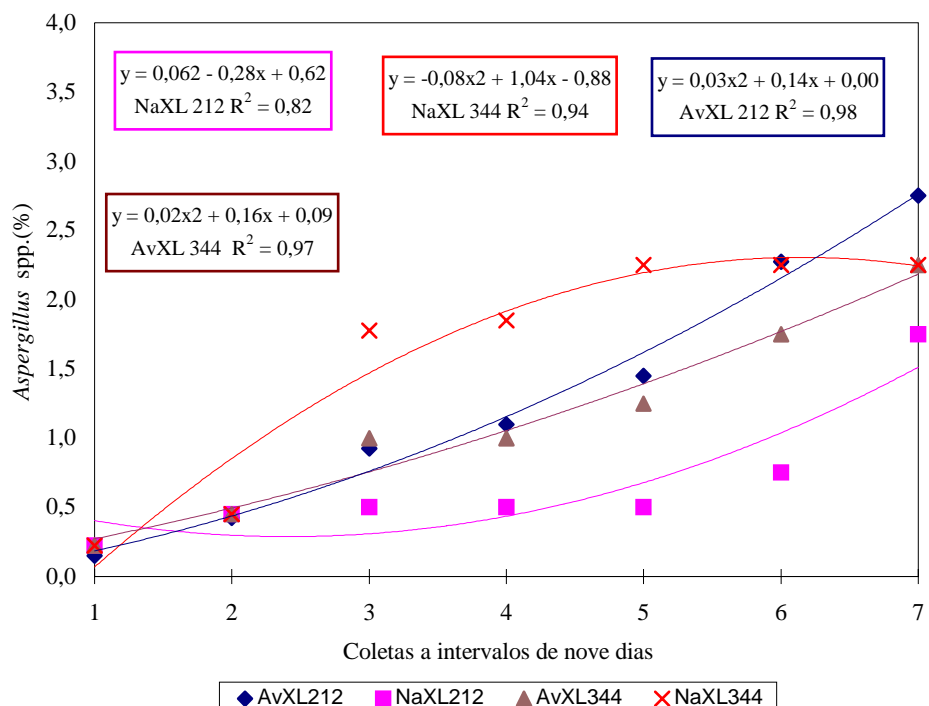


FIGURA 2- Incidência de *Aspergillus* spp. em grãos de milho dos híbridos XL 212 e XL 344 cultivados sobre coberturas verdes de solo (Av = aveia preta, Na = nabo forrageiro). Safra 99/00.

4.3.2.2 Incidência de *Cephalosporium* spp.

As incidências das espécies de *Cephalosporium* spp., de acordo com a Figura 3, foram semelhantes nos dois híbridos cultivados sobre as duas coberturas de solo. As médias alcançaram valores entre 36 e 52,00% na última coleta. Na faixa de umidade entre a terceira e a quarta coleta (Tabela 1), considerada pela literatura época adequada para a colheita, as médias de incidência variaram, aproximadamente, de 39,0% a 25,0%. Esses resultados se aproximam dos obtidos por Trento (2000), que detectou 20,75% e 58,09% incidências de *Cephalosporium* spp., respectivamente, nas safras agrícolas 97/98 e 98/99, em lavouras de milho cultivadas com rotação de culturas e plantio direto.

A literatura que relata a presença de *Cephalosporium* spp. na cultura do milho não traz referências sobre a epidemiologia e a patologia desse fungo. Essa deficiência de informação dificultou uma análise mais acurada sobre sua presença nos grãos. A literatura traz apenas relatos de incidência: por Pinto (1998), em sementes e Casa et al. (1998) e Trento (2000), em grãos de milho.

Outro aspecto observado em relação a *Cephalosporium* spp. foi o incremento de sua incidência (Figura 3) a partir do momento em que o fungo *F. moniliforme* apresenta redução (Figura 5). Os resultados levam a especular que as espécies de *Cephalosporium* encontraram ambiente mais favorável para o crescimento à medida que o *F. moniliforme* teve seu crescimento reduzido. Esses resultados podem corroborar os obtidos por King (1981), que relatou a inibição de *Cephalosporium* spp. pelo *F. moniliforme*.

Por outro lado, os resultados não revelaram competição entre o gênero *Cephalosporium* (Figura 3) e os fungos dos gêneros *Aspergillus* (Figura 2) e *Penicillium* (Figura 6), que apresentaram incremento de incidência simultâneo.

A incidência de *Cephalosporium* spp. manteve-se em elevação durante todo o período de avaliação (R^2 superior a 0,92), enquanto avançaram a senescência das plantas de milho e a redução da umidade nos grãos. No decorrer das avaliações, a incidência de *Cephalosporium* spp. no híbrido XL 212 manteve-se ligeiramente superior, conforme curvas de regressão, independentemente do tipo de cobertura (Figura 3).

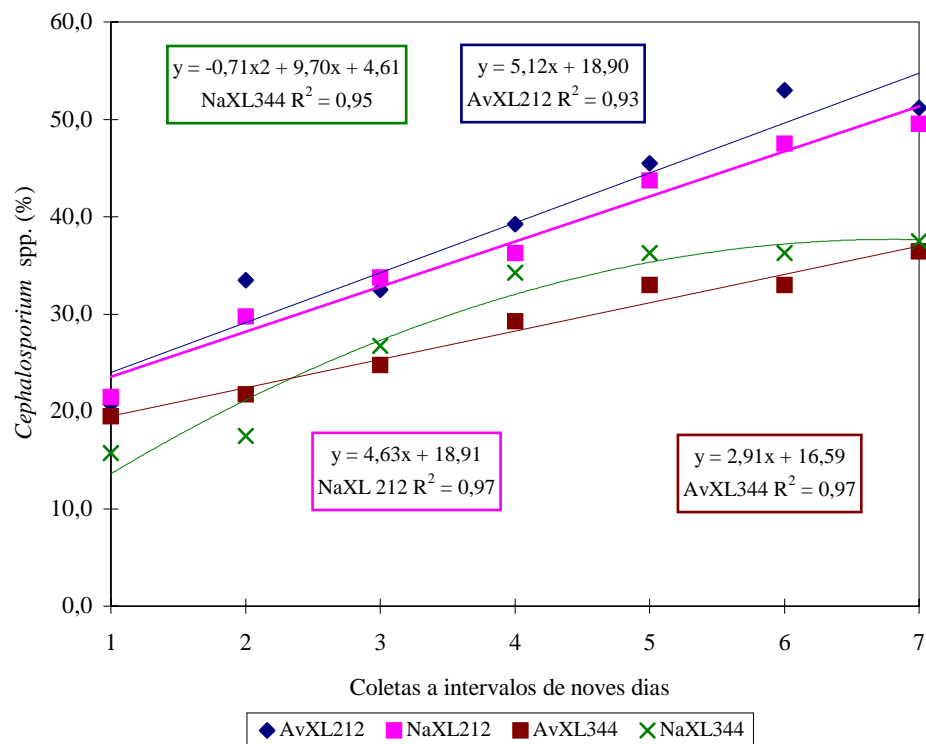


FIGURA 3- Incidência de *Cephalosporium* spp. em grãos de milho dos híbridos XL 212 e XL 344 cultivados sobre as coberturas verdes de solo (Av = aveia preta, Na = nabo forrageiro). Safra 99/00.

4.3.2.3 Incidência de *Fusarium graminearum*.

Na Figura 5, observa-se que a espécie do fungo *F. moniliforme* apresentou redução de incidência, ao passo que o fungo *F. graminearum* revelou incremento (Figura 4). Esses resultados sugerem haver competição entre as duas espécies de fungos e não confirmam Wicklow et al. (1988), que relataram a inibição de *F. graminearum* pelo *F. moniliforme*.

Outro aspecto que pode ser especulado foi a preferência do *F. graminearum* pelos grãos com menor teor de umidade, em razão de sua incidência ter se dado à medida que o teor de umidade se reduzia neles.

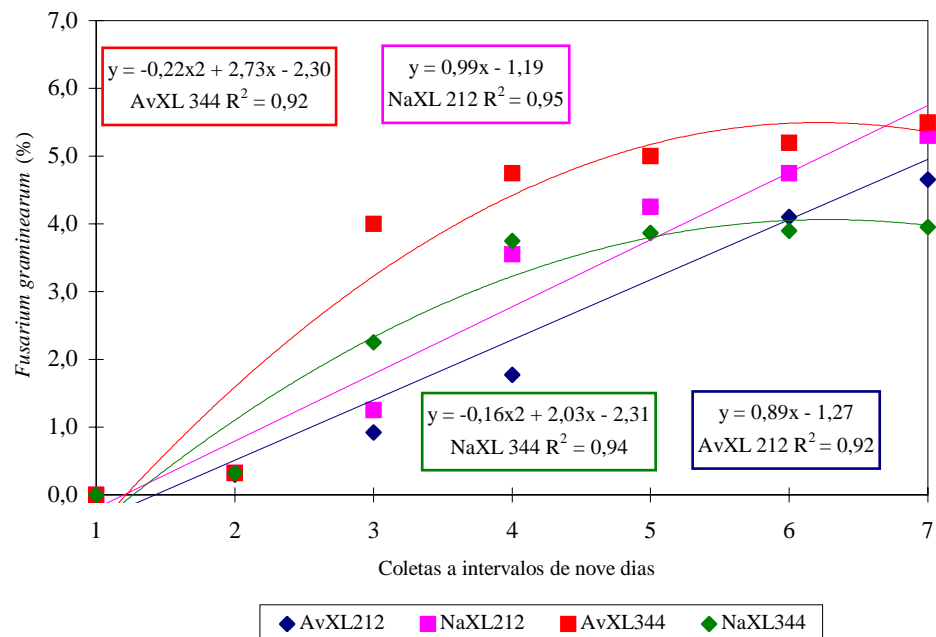


FIGURA 4- Incidência de *Fusarium graminearum* em grãos de milho dos híbridos XL 212 e XL 344 cultivados sobre coberturas verdes de solo (Av = aveia preta, Na = nabo forrageiro). Safra 99/00.

As médias de incidência mais elevadas independentemente do híbrido e da cobertura verde utilizada foram obtidas nas duas últimas avaliações (entre 3,9% a 5,5%), e a média de incidência na quarta coleta,

considerada a coleta mais próxima da umidade de colheita, foi de 3,8%, para os dois híbridos, resultados semelhantes aos de Trento (2000), que detectou 3,76% na colheita da safra agrícola 98/99. A espécie de fungo *F. graminearum* apresentou incremento acentuado (R^2 superior a 0,91) nos dois híbridos a partir da segunda coleta e manteve a elevação à medida que os grãos perderam a água na lavoura.

4.3.2.4 Incidência de *Fusarium moniliforme*

Os resultados revelaram que a incidência do fungo *F. moniliforme* foi se elevando (Figura 5) até a terceira avaliação, período no qual os grãos apresentavam elevada atividade água. Esse resultado se aproxima das observações de Reis & Casa (1996), os quais relataram que as espigas são mais suscetíveis ao ataque de *F. moniliforme* dois dias após a exposição dos estigmas e, num menor grau, até quarenta dias após.

Os resultados da incidência de *F. moniliforme* foram semelhantes para ambos os híbridos e coberturas. A média na incidência se reduzindo à medida que os grãos perdiam água, sugerindo que a atividade metabólica de *F. moniliforme* foi mais acentuada no início do período da maturação fisiológica quando apresentaram o máximo de nutrientes. A média de 62,0% de incidência, na quarta coleta, ocorreu quando foi detectado o percentual mais elevado de GA (Figura 1). Esse intervalo de grau de umidade entre a terceira e quarta avaliações é indicado para a realização da colheita, de acordo com as recomendações da literatura.

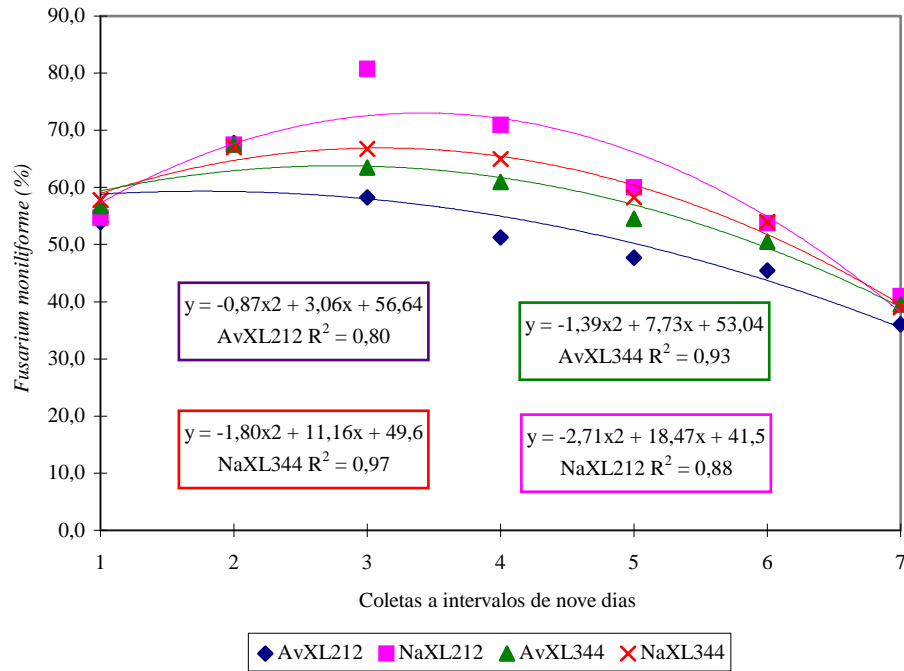


FIGURA 5- Incidência da espécie *Fusarium moniliforme* em grãos de milho dos híbridos XL 212 e XL 344 cultivados sobre as coberturas verdes de solo (Av = aveia preta, Na = nabo forrageiro). Safra 99/00.

A redução da incidência entre a primeira e a última avaliação indicou uma queda aproximada de 50% da viabilidade do inóculo (Figura 5). Esse fato pode estar relacionado com a redução da umidade dos grãos e a dificuldade do fungo *F. moniliforme* obter os nutrientes nessas condições. A média de incidência obtida ao final das avaliações, apesar da queda acentuada durante o período das coletas, manteve-se próxima de 40,0% ao final e pode ser considerada elevada.

4.3.2.5 Incidência de *Penicillium* spp

A incidência de *Penicillium* spp. elevou-se (Figura 6) à medida que ocorreu o atraso da colheita do milho e, conseqüentemente, os grãos perderam umidade e tiveram sua atividade fisiológica reduzida.

Esse resultado pode apontar a preferência do fungo por grãos com baixos teores de umidade (Tabela 1) e atividade fisiológica reduzida. Assim sendo, encontram respaldo em Reis & Casa (1999), os quais enfatizam que as espécies de *Penicillium*, consideradas fungos de armazenamento, não colonizam substratos vegetais metabolicamente ativos, e em Agarwal & Sinclair (1997) que observam que esses fungos se restringem a colonizar material orgânico seco ou morto.

A maior incidência desse fungo ocorreu no híbrido XL 344 cultivado sobre a cobertura de nabo, ao passo que as incidências em XL 344 cultivado sobre aveia e XL 212 cultivado sobre aveia e nabo foram semelhantes. As incidências em ambos os híbridos independentemente de coberturas, tiveram um incremento acentuado provavelmente influenciado pela redução da umidade nos grãos em consequência do retardamento da colheita.

A elevada infecção dos grãos por *Penicillium* spp. na lavoura, acima de 10,0%, detectada na última coleta, revelou que a presença do agente causal da podridão de penicilium pode prejudicar o armazenamento do produto caso não seja realizada a secagem adequada. Segundo Smith & White (1988), a incidência do fungo antes da colheita e o teor de umidade dos grãos são alguns dos fatores que comprometem a conservação dos grãos durante o armazenamento.

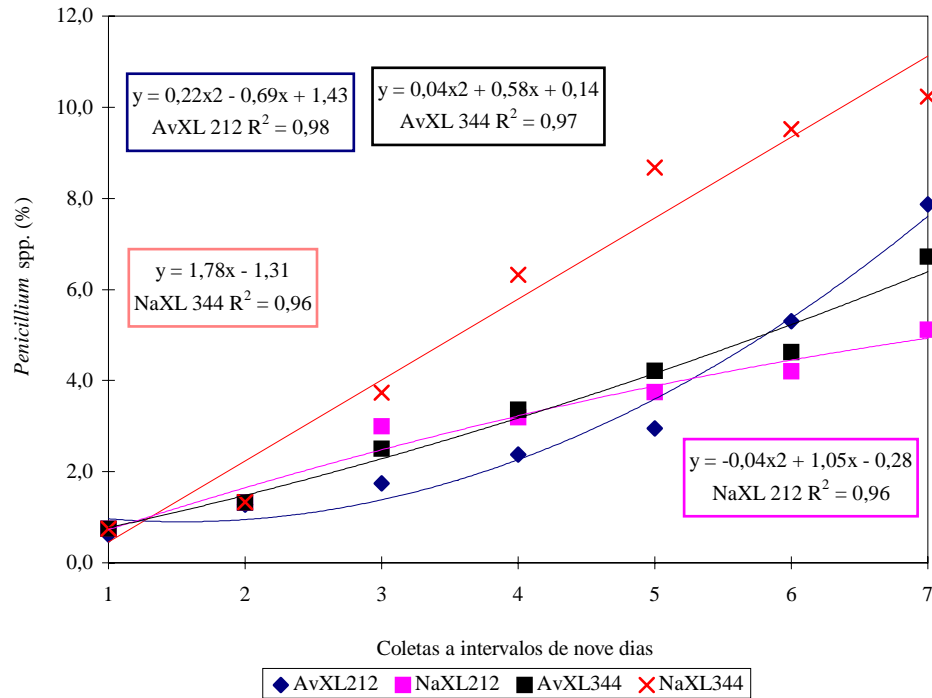


FIGURA 6. Incidência de *Penicillium* spp. em grãos de milho de híbridos XL 212 e XL 344 cultivados sobre as coberturas verdes de solo (Av = aveia preta, Na = nabo forrageiro). Safra 99/00.

As avaliações dos grãos dos híbridos realizadas ao longo da execução do experimento, em relação à presença de fungos patogênicos causadores de doença de podridão da espiga e de grãos ardidos, revelaram os fungos *Aspergillus* spp., *Cephalosporium* spp., *Fusarium graminearum*, *F. moniliforme* e *Penicillium* spp. como os de maior incidência. Outros fungos, como *Diplodia* spp., *Colletotrichum graminicola*, *Nigrospora* spp. e *Trichoderma* spp., foram detectados, porém em percentuais baixos. Esses resultados são semelhantes aos relatados por McGee (1988), Headriack & Pataky (1991), Luz (1995), os quais citam essas mesmas espécies de fungos como os principais patógenos causadores das doenças de podridões de espigas e de grãos ardidos.

4.4. CONCLUSÕES

O retardamento da colheita do milho e a redução do grau de umidade dos grãos influenciaram na redução da incidência de *Fusarium moniliforme* e no incremento da incidência de *F. graminearum* das espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Cephalosporium* e *Penicillium*;

A incidência de grãos ardidos não permitiu estabelecer relação com a cobertura verde de solo.

A incidência de grãos ardidos teve relação com a variação do grau de umidade dos grãos em consequência do retardamento da colheita.

CAPÍTULO V

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE COMERCIAL DOS GRÃOS DE MILHO NAS REGIÕES DO PLANALTO MÉDIO E ALTO URUGUAI DO RIO GRANDE DO SUL

5.1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é considerado uma das principais espécies vegetais produtoras de grãos do mundo, sendo cultivados, anualmente, cerca de 140 milhões de hectares, com uma produção superior a 600 milhões de toneladas de grãos na safra agrícola 99/2000. (Brandalitze, 2000).

Nos últimos anos, foi a cultura que mais cresceu em área de cultivo no mundo. Esse crescimento se justifica pelo fato de participar de inúmeros produtos industrializados (Dowswell et al., 1996), além de entrar diretamente na alimentação humana e nas formulações de rações (Lima & Bellaver, 2000). Haverá espaço para o crescimento dessa cultura por muito tempo, condição que também se justifica por ser, no momento, um produto barato, que custa cerca de US\$ 100/tonelada (Brandalitze, 2000)

O milho é suscetível a muitas doenças, causadas principalmente por fungos. As podridões de espigas e dos grãos ocorrem

em todas as regiões onde o milho é cultivado (Reis & Casa, 1996). Os danos causados por essas doenças podem resultar na redução do rendimento e da qualidade dos grãos, na presença de micotoxinas, na redução de massa específica, além da redução nos teores de carboidratos, proteínas e ácidos graxos, entre outros componentes da composição nutricional; representam, ainda, risco à saúde humana e dos animais que consomem grãos contaminados com micotoxinas (Programa..., 1999).

Os principais fungos causadores de doenças de espigas em lavouras do sul do Brasil são *Fusarium moniliforme* Sheld., *F. graminearum* Schwabe, *Cephalosporium* spp e *Diplodia maydis* Berk. (Sacc.), *D. macrospora* Earle, além das espécies *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Nigrospora oryzae* Berk & Br.(Luz, 1995; Reis & Casa, 1996; Casa et al., 1998; Trento, 2000).

White (1994) observou que a severidade de *F. moniliforme* e *D. maydis* pode variar de ano para ano, de propriedade para propriedade, na mesma propriedade com diferentes épocas de semeadura e entre cultivares, dependendo sobretudo de condições climáticas.

As espécies *F. moniliforme* e *F. graminearum*, agentes causais de podridões de espigas (PE) e de grãos ardidos (GA), não são controláveis pela rotação de culturas por colonizarem hospedeiros secundários e apresentarem esporos pequenos, que podem ser transportados pelo vento a longas distâncias (Reis & Casa, 1996).

As medidas de controle ou de prevenção de danos causados pelas PE e de GA compreendem a rotação de culturas, uso de genótipos resistentes, escolha de híbrido, época de semeadura, uso adequado da

população de plantas e fertilização equilibrada (Balmer & Pereira, 1987; Smith & White, 1988; Pereira, 1995; Reis & Casa, 1996; Fonseca, 1999).

O método de controle de doenças mais promissor é a resistência genética (Klapproth & Hawk, 1991; Flett & McLaren, 1994), porém a complexidade das interações genótipo x ambiente na relação patógeno-hospedeiro caracteriza um cenário complexo para o melhoramento genético, visando à resistência ou à tolerância à infecção por patógenos produtores de micotoxinas (Machado, 1999), especialmente pela ausência de sintomas visuais das infecções assintomáticas (Munkvold & Desjardins, 1997).

O princípio de controle de doenças pela rotação de culturas baseia-se na supressão do hospedeiro durante a fase saprofítica do patógeno. As PE geralmente estão relacionadas com os patógenos que sobrevivem nos restos culturais, e uma das principais medidas para a sua redução é a realização da rotação de culturas com espécies não suscetíveis (Ullstrup, 1964; Shurtleff, 1992; Reis & Casa, 1996).

Há evidências de que um mesmo híbrido pode responder de forma diferente dentro de um microclima regional quanto à produtividade, estatura, ciclo, rendimento, qualidade nutricional e sanidade. A escolha de híbridos com as características desejadas pelo produtor pode elevar o rendimento e a qualidade dos grãos e reduzir a severidade das doenças de PE e dos GA (Flett & Wehner, 1992; Pereira, 1995; Sandini & Wobeto, 1998).

A população de plantas de milho determina uma maior competição por água, nutrientes e luminosidade, que, associados à deficiência ou ao desequilíbrio de N e K, podem contribuir para o

aumento da incidência das PE e de GA (Pereira, 1995; Fonseca, 1999; Fancelli, 2000).

A maturação dos grãos de milho é caracterizada pela formação de uma camada preta na base do grãos interrompendo sua conexão nutricional com a planta, que ocorre com a umidade entre 40 a 30%. A colheita mecânica neste ponto é inviável, sendo conveniente aguardar que os grãos percam água. Nesse período, os grãos continuam a respirar e a perder peso. A colheita é bem sucedida quando se conhece a curva de secagem, na lavoura, de cada cultivar híbrido ou variedade, o que depende do ciclo da cultivar, das condições climáticas e da época de semeadura. A umidade entre 18 e 26% é a mais recomendada para a colheita mecânica (Mantovani, 1989; Eichelberger, 2000).

Baseado nessas considerações, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de quantificar a incidência de grãos ardidos, de fungos patogênicos, o percentual de grãos com injúria mecânica visível, o percentual de grãos normais e a redução do teor de umidade dos grãos de híbridos de ciclo precoce na lavoura, com vistas a avaliar a qualidade comercial dos grãos de milho nas regiões do Alto Uruguai e Planalto Médio do Rio Grande do Sul.

O objetivo foi formulado com base na hipótese de que as práticas de controle cultural influenciam na qualidade comercial dos grãos de milho colhidos em lavouras comerciais.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Local e época

Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia e no Laboratório de Análises de Micotoxinas do Centro de Pesquisa em Alimentação da Universidade de Passo Fundo, no período compreendido entre outubro de 1998 a julho de 2000.

5.2.2 Experimento de campo

Os experimentos foram desenvolvidos na lavoura Experimental de Escola Agrotécnica Federal de Sertão (EAFS), em Sertão - RS, nos silos de armazenamento da Cooperativa Tritícola Erechim Ltda. (Cotrel), em Erechim - RS, e nos silos de armazenamento da empresa Cerealista Lodi Ltda. (Lodi), em Marau - RS.

O experimento executado na Escola Agrotécnica Federal de Sertão (EAFS) foi conduzido por semeadura direta com rotação de culturas soja/aveia preta/milho. Foram cultivados 14 híbridos de milho em parcela única para cada cultivar, com oito linhas de 40 m com seis plantas por metro e espaçamento entre linhas de 0,90m.

As avaliações e as determinações foram realizadas no Laboratório de Micotoxinas do Centro de Pesquisa em Alimentos, no Laboratório de Fitopatologia do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade de Passo Fundo e no Laboratório de Microbiologia Fitopatológica do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da UFRGS, no período compreendido entre outubro de 1999 a janeiro de 2001.

5.2.3 Amostragem de grãos na recepção dos silos

A amostragem dos grãos de milho, transportados em caminhões da lavoura até o silo de armazenamento, foi realizada no momento da pesagem, com auxílio de calador de grãos, e durante o descarregamento, na moega, através de coletas de porções de cerca de 500 g, que foram colocadas em saco ou bombona, ambas as vasilhas com capacidade para 60 kg de grãos. Após homogeneizados, os grãos constituíram a amostra final, com cerca de 40 kg para cada carga de caminhão, proveniente da mesma lavoura e cultivada com o mesmo híbrido. Dessa amostra final foram extraídas cinco subamostras laboratoriais de 1,0 kg, que foram utilizadas para realizar as avaliações de incidência de grãos ardidos e de fungos patógenos, percentual de grãos com injúria mecânica visível e percentual de grãos normais. Durante a coleta da amostra, foi determinada a umidade dos grãos.

5.2.4 Amostragem de grãos na Escola Agrotécnica Federal de Sertão

O experimento executado na Escola Agrotécnica Federal de Sertão foi conduzido em parcela única para cada cultivar, em oito linhas de 40 m com seis plantas por metro e espaçamento entrelinhas de 0,90 m. Foram cultivados 16 híbridos em plantio direto com cobertura de solo, no verão, soja e, no inverno, aveia preta. Todos os híbridos foram semeados no dia 20 de outubro de 1999 e coletados no dia 15 de abril de 2000.

As amostras foram obtidas através da coleta dos grãos seguindo o método desenvolvido por Reis et al. (1998), o qual consistiu na escolha aleatória simples de cinco pontos distribuídos equidistantes

dentro da área do experimento da lavoura. Foram coletadas todas as espigas de milho numa extensão de dez metros de uma fila com seis plantas por metro para cada ponto de amostragem determinado.

5.2.5 Determinação da umidade dos grãos

A umidade foi determinada com medidor portátil marca Multi-Grain, modelo 46233-12, série 1233-10542, manufaturado por Dickey - John Corporation - Auburn, Yllinois - EUA.

5.2.6. Incidência de grãos ardidos

Conforme Brasil (1996), o critério usado para a determinação de incidência de GA consiste na separação visual dos grãos com sintomas de descoloração em mais de um quarto da sua superfície total do grão, causada pela infecção por fungos, a partir de uma amostra de 250 g de grãos por amostra. Neste trabalho, utilizaram-se quatro repetições de 250 g de grãos de cada amostra. A média dos resultados foi transformada em porcentagem, que corresponde à incidência de grãos ardidos na amostra.

5.2.7 Incidência de fungos patogênicos

Foi utilizada uma subamostra laboratorial de 150 g de cada amostra proveniente das coletas. Os grãos foram desinfestados com álcool a 70% por dois minutos; em seguida, com hipoclorito de sódio a 2%, durante 2 minutos, e, posteriormente, enxaguados duas vezes em água destilada e esterilizada.

Os grãos foram plaqueados em placas de petri contendo o meio de cultura um quarto de BSA (50 g de batata, 5 g de sacarose, 20 g ágar e 500 ppm de sulfato de estreptomicina).

As incidências de fungos associados aos grãos foram obtidas de uma amostra composta por quatro subamostras (repetições) de cem grãos (Brasil, 1992). Os grãos foram plaqueados num arranjo experimental de quatro repetições de vinte placas com cinco grãos e incubados em câmara de crescimento com temperatura de 23-25 °C e fotoperíodo de 12 horas, por cinco a sete dias. Após, com auxílio de lupa estereoscópica e microscópio ótico, procedeu-se à identificação dos fungos.

Os resultados foram expressos em incidência média de fungos, resultante da média aritmética das quatro repetições. As médias de incidência obtidas em números absolutos foram convertidas em valores relativos.

5.2.8 Grãos normais

Os grãos normais (GN) representam os grãos sadios e inteiros com ausência de sinais de injúrias visíveis causadas por agentes nocivos. Para a determinação foram utilizadas quatro subamostras de 250g de grãos de amostra homogênea. O resultado absoluto das médias de grãos normais foi convertido em valores percentuais.

5.2.9 Determinação da injúria mecânica visível

A injúria mecânica visível (IMV) de grãos foi determinada pelos sintomas visuais, conforme critério de Bergamin Filho (1995), que define injúria como qualquer sintoma visível causado por um organismo

nocivo. Foram utilizadas quatro subamostras de 250g de grãos da amostra homogênea. Foram separados todos os grãos quebrados e que apresentavam injúria no tegumento. O peso foi corrigido para 14,5% de umidade dos grãos e as médias, transformadas em porcentagem.

5.2.10 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi completamente casualizado (DCC). Os tratamentos foram constituídos pelo volume de 40 kg de grãos de cada híbrido coletado. Foram obtidos 35 tratamentos (coletas) na recepção dos silos da empresa Lodi, em Marau - RS; sete na cooperativa Cotrel Ltda., em Erechim - RS, e 14 no experimento executado na Escola Agrotécnica Federal de Sertão, em Sertão - RS.

Os resultados dos tratamentos, obtidos de quatro repetições da unidade experimental, foram submetidos à técnica de análise variância univariada a 5% de probabilidade, pelo teste F de significância. Nessas análises, utilizou-se o programa computacional Sistema de Análise de Variância - versão 3.02 - SISVAR.

As médias dos resultados da incidência de GA, IMV e GN foram analisadas pelo método de Scott-Knott a 5% de probabilidade para o agrupamento das médias. Nessa análise, foi utilizado o programa computacional SAEG.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. Caracterização dos experimentos

A média de rendimento das lavouras alcançou a produção de 5.161 kg/ha (Tabela 1), 6.000 kg/ha (Tabela 2) e 4.782 kg/ha (Tabela 3),

sendo que cerca de 80,0% das lavouras de milho foram conduzidas com rotação de culturas; 50,0%, com coberturas verdes e 90,0%, com plantio direto. As médias de umidade dos grãos nos três experimentos foram, respectivamente, de 18,1%, 18,0% e 19,3% (Tabelas 1, 2 e 3).

A prática de rotação de culturas associada à semeadura direta e a introdução de coberturas verdes de solo podem melhorar a qualidade do solo, reduzir a severidade das doenças de espigas e de grãos ardidos, aumentar a produtividade e melhorar a qualidade comercial dos grãos. O inóculo na semente ou grão encontra-se na forma de micélio dormente; nos restos culturais, na forma de picnídios que liberam os conídios (Reis e Casa, 1996). Essas fontes de inóculo podem infectar a planta e os grãos via raiz e/ou via estigmas.

O sistema plantio direto, praticado em cerca de 90% das lavouras avaliadas, revelou que os produtores estão preocupados com a preservação do solo e do ambiente de trabalho. Por outro lado, esta prática apresenta o inconveniente de possibilitar uma sobrevivência mais prolongada dos patógenos necrotróficos, associados aos restos culturais que permanecem sobre a superfície do solo.

A disponibilidade de alimento para os patógenos deve ser interrompida pela prática de rotação de culturas, praticada em cerca de 80% das lavouras.

TABELA 1- Identificação dos híbridos e das respectivas práticas de manejo das lavouras comerciais na safra agrícola 99/00. Os grãos coletados na recepção dos silos da empresa Lodi.

Híbridos	N.	Plantio	Ciclo	Rend ^d	C.ver ^e	S. ant ^f	Ép pla ^g	Ép col ^h	U% col ⁱ	T.grão ^j	Classe ^l
G 800	1	direto	precoce	4.500	s/cob ^p	soja	28/10/99	f mai/00 ^s	17,2 ⁿ	semdur	amarelo
G 800	2	direto	precoce	6.000	aveia	soja	28/10/99	f mai/00	19,5	semdur	amarelo
G 800	3	direto	precoce	6.000	aveia	soja	28/10/99	f mai/00	17,2	semdur	amarelo
XL 212	4	direto	precoce	4.800	past ^d	soja	11/12/99	f mai/00	21,2	semdur	amarelo

XL 212	5	direto	precoce	4.200	s/cob	soja	10/11/99	f mai/00	17,4	sem den	amarelo
XL 212	6	direto	precoce	6.000	aveia	soja	12/11/99	f mai/00	17,5	sem den	amarelo
XL 212	7	direto	precoce	5.100	azev ^r	soja	28/10/99	i jun/00 ^t	17,1	sem den	amarelo
XL 212	8	direto	precoce	4.200	s/cob	soja	10/10/99	i jun/00	16,5	sem den	amarelo
XL 212	9 ^y	direto	precoce	9.600	s/cob	milho	10/10/99	i jun/00	16,1	sem den	amarelo
XL212	10	direto	precoce	4.800	s/cob	milho	23/10/99	f mai/00	16,1	sem den	amarelo
XL212	11	direto	precoce	6.000	past	soja	02/11/99	f mai/00	16,7	sem den	amarelo
AG 122	12	direto	precoce	5.040	aveia	soja	25/10/99	f mai/00	17,5	dentado	amarelo
AG 122	13	conv ^o	precoce	3.000	past	pastg	06/11/99	f mai/00	21,0	dentado	amarelo
P 3063	14	direto	precoce	4.800	past	soja	01/09/99	f mai/00	15,0	sem dur	amarelo
P 3063	15	direto	precoce	6.600	aveia	soja	11/12/99	f mai/00	20,4	sem dur	amarelo
AG 6018	16	direto	supprec	6.900	s/cob	milho	20/11/99	f mai/00	18,0	sem dur	amarelo
AG 6018	17	direto	supprec	6.900	s/cob	milho	24/11/99	f mai/00	17,0	sem dur	amarelo
AG 3010	18	direto	upprec	5.100	past	milho	10/11/99	f mai/00	23,0	duro	amarelo
AG3016	19	conv	supprec	6.900	cevd	soja	29/11/99	f mai/00	21,4	duro	alaranj
AG 3016	20	conv	supprec	6.800	cevd	soja	30/11/99	f mai/00	21,0	duro	alaranj
AG 6016	21	direto	supprec	4.800	past	milho	11/12/99	f mai/00	21,5	duro	alaranl
Premium	22	direto	precoce	4.800	azev	soja	20/10/99	i jun/00	16,0	duro	laranja
TORK	23	direto	precoce	5.100	aveia	soja	10/11/99	i jun/00	20,0	duro	laranja
VELOZ	24	direto	supprec	4.500	azev	soja	20/11/99	i jun/00	19,4	duro	alaranj
P 3071	25	direto	precoce	5.400	aveia	soja	15/11/99	i jun/00	23,0	duro	alaranj
P 3071	26	direto	precoce	5.200	azev	soja	10/11/99	i jun/00	16,4	duro	alaranj
P 3071	27	direto	precoce	6.000	s/cob	soja	15/12/99	i jun/00	22,0	duro	alaranj
P 3069	28	direto	supprec	5.400	azev	soja	10/10/99	i jun/00	18,0	duro	alaranj
AG 303	29	direto	precoce	3.600	past	soja	04/12/99	i jun/00	21,5	dentado	amarelo
AG 6018	30	direto	supprec	4.700	s/cob	s/cob	10/10/99	i jun/00	18,0	sem dur	amarelo
AG 5011	31	direto	precoce	4.800	past	soja	20/10/99	i jun/00	17,3	sem den	amarelo
Premium	32	direto	precoce	4.800	pastg	soja	04/12/99	i jun/00	17,3	duro	laranja
C 909	33	direto	supprec	4.800	aveia	soja	20/10/00	i jun/00	17,4	sem dur	laranja
Agn3050	34	direto	supprec	2.300	s/cob	soja	10/11/99	f mai/00	17,4	duro	laranja
Z8486	35	direto	precoce	5.200	aveia	soja	08/11/00	i jun/00	18,0	sem dur	amarelo

^d-rendimento em kg/ha; ^e-cobertura verde de solo; ^f-cultura cultivada na safra primavera-verão anterior; ^g-época de plantio; ^h-época de colheita dos grãos; ⁱ-umidade de colheita; ^j-tipo de grão; ^y-lavoura irrigada. ^M-média de rendimento dos híbridos das lavouras avaliadas = 5.161 kg/ha; ⁿ-média de umidade dos grãos na colheita = 18,1%. ^o-conv- cultivo convencional; ^p-s/cob - sem cobertura; ^q-pastg - pastagem; ^r-azev - azevém; ^s-f.mai/00 - colheita realizada no fim de maio/00; ^t-i. jun/00 - colheita realizada no início de junho/00.

TABELA 2- Identificação dos híbridos e das respectivas práticas de manejo das lavouras comerciais na safra agrícola 99/00. Os grãos dos híbridos foram coletados na recepção dos silos da Cotrel.

Híbridos	N.	Plantio	Ciclo	Rend ^d	C. inv ^e	S. ant ^f	Ép. pla ^g	Ép. col ^h	U% col ⁱ	T grão ^j	Classe
P30F33	1	conv	precoc	7.800 ^m	ervilh	milho	8/11/00	f mai/00	19,6 ⁿ	duro	alar
C 805	2	direto	suppre	5.100	s/cob	milho	10/11/99	ijun/00	18,1	sem dur	amar

AG 122	3	conv	precoc	4.800	s/cob	milho	09/10/99	ijun/00	18,0	dentad	amar
Z 8392	4	conv	suppre	5.700	s/cob	milho	29/10/99	ijun/00	16,5	semdur	alar
XL 212	5	conv	precoc	7.200	ervilh	feijão	20/09/99	fmai/00	17,2	semden	amar
C 505	6	conv	precoc	4.200	s/cob	feijão	15/09/99	fmai/00	17,8	semdur	amar
P30F80	7	direto	precoc	7.200	tritical	soja	22/11/99	ijun/00	18,9	duro	alar

^b-sistema plantio; ^d-rendimento em kg/ha; ^e-cobertura verde de solo; ^f-cultura cultivada na safra primavera-verão anterior; ^g-época de plantio; ^h-época de colheita dos grãos; ⁱ-umidade de colheita; ^j-tipo de grão; ^m-média de rendimento dos híbridos das lavouras avaliadas = 6.000 kg/ha; ⁿ-média de umidade dos grãos na colheita = 18,0%.

TABELA 3- Identificação dos híbridos e das práticas de manejo empregadas no experimento da EAFS na safra agrícola 99/00. Os grãos dos híbridos foram coletados durante a colheita do experimento.

Híbridos	N.	Plântio	Ciclo ^c	Rend ^d	C ver ^e	S. ant ^f	Ép pla ^g	Ép col. ^h	U% col ⁱ	T. grão ^j	Classe ^l
C833	1	direto	precoc	5.873 ^m	avpret	soja	20/10/99	15/04/00	18,0 ^N	semden	amar
Premium	2	direto	precoc	5.465	avpret	soja	20/10/99	15/04/00	20,5	duro	laran
C 813	3	direto	precoc	5.328	avpret	soja	20/10/99	15/04/00	19,4	semden	amar
SHS 8447	4	direto	precoc	5.312	avpret	soja	20/10/99	15/04/00	18,3	duro	laran
Dina766	5	direto	precoc	5.270	avpret	soja	20/10/99	15/04/00	16,7	semdur	alar
SHS 5050		direto	n prec	5.178	avpret	soja	20/10/99	15/04/00	19,9	duro	laran
TORK	6	direto	precoc	4.003	avpret	soja	20/10/99	15/04/00	20,1	duro	laran
AG 8080		direto	nprec	4.854	avpret	soja	20/10/99	15/04/00	24,0	duro	amar
AS3466	7	direto	precoc	4.682	avpret	soja	20/10/99	15/04/00	21,1	duro	laran
AG 60	8	direto	precoc	4.563	avpret	soja	20/10/99	15/04/00	15,5	duro	alar
Al25Var	9	direto	precoc	4.509	avpret	soja	20/10/99	15/04/00	19,3	semdur	alar
Dina657	10	direto	precoc	4.363	avpret	soja	20/10/99	15/04/00	24,0	semdur	alar
P 33F33	11	direto	precoc	4.343	avpret	soja	20/10/99	15/04/00	18,5	duro	alar
AS 523	12	direto	precoc	4.330	avpret	soja	20/10/99	15/04/00	19,5	semdur	amar
P32R21	13	direto	precoc	4.269	avpret	soja	20/10/99	15/04/00	14,0	semdur	alar
AG2288	14	direto	precoc	4.167	avpret	soja	20/10/99	15/04/00	20,3	duro	alar

^d-rendimento em kg/ha; ^e-cobertura verde de solo; ^f-cultura cultivada na safra primavera-verão anterior; ^g-época de plantio; ^h-época de colheita dos grãos; ⁱ-umidade de colheita dos grãos dos híbridos; ^j-tipo de grão; ^h-classe de grão. ^m-média de rendimento dos híbridos do experimento = 4.782 kg/ha; ⁿ-média de umidade dos grãos na colheita = 19,3%.

O elevado percentual de lavouras com rotação de culturas demonstra que os produtores estão cientes da necessidade da supressão dos restos culturais por serem uma eficiente fonte de inóculo dos patógenos causadores das doenças das podridões de espigas.

Os híbridos cultivados no experimento da EAFS (Tabela 3) apresentaram média de rendimento inferior aos híbridos das Tabelas 1 e 2, embora tenham sido aplicadas as práticas culturais adequadas para as lavouras de milho, conforme recomenda a literatura, e os grãos colhidos com média de umidade de 19,3% mais elevada que os híbridos de lavouras comerciais, com umidade de 18,1% (Lodi) e de 18,0% (Cotrel).

5.3.2 Incidência de fungos patogênicos

A incidência média do fungo *F. moniliforme* (Tabela 4), determinada em grãos de híbridos oriundos de lavouras comerciais conduzidas sob diferentes manejos, pode ser atribuída a restos culturais de milho infectados remanescentes sobre a superfície do solo, pela sua habilidade de habitar o solo, de sobreviver em hospedeiros secundários e de infectar por via sistêmica os grãos (Kedera et al., 1992). A semente infectada (Munkvold et al., 1997), os restos culturais e as plantas voluntárias foram considerados as principais fonte de inóculo dos fungos não controlados pelo sistema de rotação de culturas (Cotten & Munkvold, 1998; Reis & Casa, 1996; Smith & White, 1988).

Outra característica do *F. moniliforme* (Tabela 4) que pode justificar a elevada incidência foi sua capacidade competitiva exercida sobre *F. graminearum* (Rheeder et al., 1990; Reid et al., 1996), sobre o *Cephalosporium* spp (King, 1981) e *Aspergillus flavus* Link. (Hesseltine et al., 1977; Zummo & Scott, 1992). A associação negativa *F. moniliforme* com *F. graminearum* e *F. subglutinans*, também, foi relatada por Marasas et al. (1979). Munkvold & Desjardins (1997) destacaram o potencial de produção de micotoxinas por *F. moniliforme*.

A incidência de *F. graminearum*, 4,83% e 3,14%, em amostras de híbridos de lavouras comerciais, e de 3,36%, em lavoura com rotação de cultura (Tabela 4) pode estar associada à precipitação pluvial ocorrida durante os estágios de floração e de enchimento dos grãos ou ao atraso da colheita. Esses resultados são superiores aos relatados por Trento (2000), que obteve 1,88% em híbridos de lavouras comerciais na região do Planalto Médio na safra 98/99.

A incidência dos patógenos detectada (Tabela 4) pode ser associada aos fungos necrotróficos que colonizam restos culturais e que causam as doenças das podridões de espigas na cultura do milho. Os microrganismos que colonizam os grãos não causam redução apenas de matéria seca, mas, também, da qualidade comercial.

A incidência elevada de *Cephalosporium* spp, 29,00%, 25,54% e 44,61%, foi detectada nos três locais de coletas (Tabela 4), sendo que o percentual de 44,61% foi detectado na lavoura experimental da EAFS de Sertão, onde o experimento foi conduzido com rotação de culturas e sistema de semeadura direto. Esses resultados se aproximam dos de Trento (2000), na mesma região, o qual detectou a incidência média de 58,09% na safra de 98/99 em híbridos de nove lavouras, sendo que incidência foi maior nas lavouras com sistema de rotação de culturas.

Os resultados, conforme a Tabela 4, demonstram que a incidência das espécies de *Cephalosporium* nas lavouras comerciais foi inferior à incidência da lavoura experimental da EAFS. Este resultado sugere que o fungo, provavelmente, não sofre a influência da rotação de culturas.

TABELA 4- Incidência média de fungos patogênicos em grãos híbridos coletados na recepção dos silos da Cotrel¹ e de Lodi² e em experimento na lavoura experimental da EAFS³, onde os grãos foram colhidos manualmente e debulhados com trilhadeira no laboratório da UPF. Safra 99/00.

Fungos patogênicos	Média % ¹	C. V.%	Média % ²	C. V.%	Média % ³	C. V.%
<i>Fusarium moniliforme</i>	27,51	21,32	34,36	14,07	33,14	16,39
<i>F. graminearum</i>	4,83	25,84	3,14	26,32	3,36	24,35
<i>Cephalosporium</i> spp.	29,00	18,12	25,54	12,38	44,61	10,52
<i>Aspergillus</i> spp.	9,43	21,92	8,25	26,63	7,14	29,33
<i>Penicillium</i> spp.	14,91	24,90	10,71	25,44	19,75	19,06
<i>Diplodia</i> spp.	2,13	25,23	2,86	23,57	1,21	19,49
<i>Nigrospora</i> spp.	1,77	30,80	2,57	12,00	9,29	2,87
<i>Trichoderma</i> spp.	0,26	29,20	0,33	23,10	0,28	26,35

C V % - coeficiente de variação (percentagem) das médias do número total de amostras de grãos de híbridos avaliadas por experimento.

Os fungos do gênero *Aspergillus* apresentaram incidência elevada nos três locais avaliados, 9,43%, 8,25% e 7,14%, respectivamente, para Lodi, Cotrel e EAFS (Tabela 4). O percentual detectado revelou que as espécies de *Aspergillus* spp. iniciaram a infecção e a colonização dos grãos de milho ainda na lavoura, podendo comprometer a qualidade do produto antes de este chegar aos silos e ao armazém. Esses resultados são compatíveis com o de Trento.(2000), que detectou a incidência de 8,12% na safra 97/98 na região do Planalto Médio.

De acordo com a Tabela 4, a incidência dos fungos *Penicillium* spp. foi de 14,91% e 10,71%, nos híbridos de lavouras comerciais, e de 19,75%, na lavoura experimental da Escola Agrotécnica Federal de Sertão. Esses resultados corroboram as médias de incidência de Trento (2000), que foram de 11,54%, na safra 97/98, e de 7,19%, na

safras 98/99, e de Sandini & Wobeto (1998), os quais detectaram a média de 23,30% na safra de 96/97 na região de Guarapuava, no Paraná.

A Tabela 4 revela a média de incidência de *Diplodia* spp., que foi de 2,13% e 2,86%, para híbridos de lavouras comerciais, e de 1,21%, para híbridos da lavoura experimental. Essa incidência reduzida pode ser explicada pelo fato de o fungo ser controlado pela rotação de culturas, prática empregada no experimento da EAFS e por cerca de 80,0% das lavouras.

As incidências de *Nigrospora* spp e *Trichoderma* spp. (Tabela 4) foram esporádicas e podem estar associadas às condições climáticas favoráveis no decorrer da safra de 99/00, visto que, de acordo com McGee (1988), esses fungos necessitam de precipitação pluvial suficiente para criar ambiente úmido no período da formação das espigas e enchimento dos grãos.

5.3.3. Características dos grãos

Conforme a Tabela 6, os resultados são semelhantes para os experimentos realizados na empresa Lodi e na cooperativa Cotrel, que apresentaram, respectivamente, 83,86% e 83,93% de GN; 12,10% e 13,5% de grãos com IMV e 17,40% e 15,78% da soma de GA e IMV. As médias de incidências de GA para os três experimentos foram de 3,83%, 2,41% e 2,62%. Esses resultados possibilitam que se trace um perfil dos danos e da qualidade comercial do milho da safra 99/00 das regiões referidas.

TABELA 5- Níveis máximos permitidos pela resolução 103 do Concex.

Tipo de grãos	Unidade	Ardidos/ brotados	Avariados/ carunchados	Impurezas/ fragmentos	Umidade (%)
1	%	3	11	1,5	14,5
2	%	6	18	2,0	14,5
3	%	10	24	3,0	14,5

As porcentagens e as incidências foram respostas qualitativas e quantitativas que podem ser associadas às práticas culturais empregadas na implantação e na condução das lavouras de milho e, possivelmente, às condições climáticas da safra, porém não permitem identificar os fatores que mais contribuíram para a redução da produção.

TABELA 6- Médias dos efeitos das práticas culturais na caracterização dos grãos de híbridos comerciais das regiões do Planalto Médio e do Alto Uruguai do RS. Os grãos foram coletados na recepção dos silos da empresa cerealista Lodi¹, da cooperativa Cotrel² e na lavoura experimental da Escola Agrotécnica Federal da Sertão³. Safra 99/00.

Grãos de híbridos	Média % ¹	C V%	Média % ²	C V%	Média % ³	C V%
Grãos Normais	83,86	1,52	83,93	1,64	n a	n a
Grãos Ardidos	3,83	12,16	2,41	13,53	2,62	9,20
Injúria Mecânica Visível	12,10	7,81	13,50	7,91	n a	n a
GA + IMV ⁴	17,40	26,51	15,78	8,66	n a	n a
Impurezas	0,25	22,20	0,20	26,60	n a	na

⁴- soma das médias de incidência dos Grãos Ardidos (GA) e dos grãos com Injúria Mecânica Visível (IMV); n a - não avaliado; C V % - coeficiente de variação (porcentagem) das médias do número total de amostras de grãos coletados no experimento.

Dessa forma, conforme os resultados obtidos na Tabela 6, relacionados com os padrões estabelecidos pela Tabela 5, os grãos colhidos seriam classificados como do tipo 2.

Os danos que a produção sofreu podem trazer perdas financeiras para o produtor, embora essa função seja difícil de ser determinada num país de área agrícola continental e de economia instável como é o Brasil.

Esses resultados, entretanto, podem influir no valor comercial da produção em razão da tendência crescente da importância do milho e seus derivados no contexto comercial, onde o mercado competitivo exige um produto com atributos e características de acordo com as exigências comerciais e nutricionais.

As características avaliadas possibilitaram constatar que, em média, 14,00% dos grãos recebidos nos silos de armazenagem apresentavam injúria relacionada ao conjunto de fatores envolvidos no contexto produtivo. É bem provável que a maior influência nesse resultado esteja relacionada com a operação da colheita, por causa da média aproximada de 13,00% de grãos com IMV. Esse percentual leva a que se concorde com Mantovani (1989), o qual observou que a colheita é uma operação que deve ser realizada com o máximo de planejamento para que dela se tire o maior rendimento possível na produção de grãos e com o mínimo de dano.

Os resultados e as determinações possibilitaram especular que a maioria dos produtores não possuem estrutura adequada para a colheita da produção ou preferiu colher o produto com baixa umidade; por consequência, o milho permaneceu na lavoura, onde os grãos tiveram reduzida a sua umidade.

TABELA 7- Médias percentual de grãos normais (GN), e grãos com injúria mecânica visível (IMV) e incidência de grãos ardidos (GA) de híbridos comerciais coletados na recepção dos silos da empresa Lodi. A média representa 35 híbridos de lavouras comerciais. C V% = 1,52 (GN); C V.% = 12,06 (GA); C V% = 97,32 (IMV). Safra 99/00.

N. híbrido ¹	Híbridos	N. híbrido ¹	GN	N. híbrido ¹	GA	N. híbrido	IMV
1	G 800	12	94,56 ² a ³	9	11,10 ² a ³	13	26,10 ² a ³
2	G 800	8	90,00 b	18	8,35 b	34	18,69 b
3	G 800	23	90,03 b	8	8,28 b	5	18,38 b

4	XL 212	20	89,10 b	30	5,55 c	24	18,08 b
5	XL 212	25	88,40 b	31	5,20 c	7	17,60 b
6	XL 212	19	87,30 c	11	5,18 c	22	16,68 c
7	XL 212	32	87,20 c	17	4,75 d	33	15,95 c
8	XL 212	18	87,03 c	5	4,48 d	10	15,43 d
9 ^y	XL 212	15	86,60 c	6	4,43 d	28	15,00 d
10	XL 212	14	86,48 c	16	4,40 d	26	14,80 d
11	XL 212	5	86,30 c	4	4,38 d	31	14,23 e
12	AG 122	17	86,10 c	13	4,33 d	1	13,40 e
13	AG 122	3	85,49 d	34	4,29 d	2	13,40 e
14	P 3063	21	84,46 d	10	4,25 d	27	13,30 e
15	P 3063	6	84,45 d	28	3,90 e	1	13,10 e
16	AG 6018	9	84,23 d	1	3,83 e	3	13,05 e
17	AG 6018	16	84,08 d	19	3,48 e	21	13,05 e
18	AG 3010	29	83,98 d	24	3,43 e	29	13,05 e
19	AG 3016	2	83,93 d	7	3,38 e	4	12,93 e
20	AG 3016	26	83,65 d	35	3,28 e	30	12,78 e
21	AG 6016	27	83,13 e	27	3,25 e	16	11,13 f
22	Premium	1	83,10 e	15	3,20 e	14	10,55 f
23	TORK	4	82,98 e	14	2,95 f	32	10,50 f
24	VELOZ	3	82,03 e	2	2,90 f	15	9,98 f
25	P 3071	22	81,70 e	3	2,90 f	25	9,56 g
26	P 3071	30	81,58 e	29	2,60 f	19	9,10 g
27	P 3071	11	81,53 e	21	2,54 f	20	9,10 g
28	P 3069	10	81,20 e	25	2,35 f	23	8,86 g
29	AG 303	8	80,20 f	32	2,28 f	5	8,70 g
30	AG 6018	31	80,08 f	22	1,98 g	17	7,75 g
31	AG 5011	7	79,18 f	20	1,75 g	9	4,63 h
32	Premium	35	78,78 g	12	1,55 g	8	4,35 h
33	C 909	24	78,00 g	26	1,53 g	12	3,80 h
34	AGN 50	34	77,49 g	33	1,25 g	6	1,70 i
35	Z8486	13	70,63 h	23	1,16 g	8	1,63 i

¹- Número de híbrido que corresponde ao nome comercial na tabela; ²- Médias de quatro repetições de 250g de grãos de um mesmo híbrido e da mesma lavoura; ³ - Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade; ^y - lavoura irrigada.

Essas especulações foram influenciadas pelas médias das umidades de 18,00% e 18,01% nos experimentos representados nas Tabelas 1 e 2.

Outro aspecto implícito nos fatores envolvidos no ciclo produtivo da cultura do milho é o desconto que é aplicado aos grãos colhidos e comercializados com umidade elevada.

O produtor, para não sofrer descontos pelo excesso de umidade, prefere deixar o milho na lavoura. Contudo, submeter o milho

com a umidade adequada para a colheita à permanência na lavoura em condições adversas do meio ambiente pode ser mais danoso que ter descontos no ato da comercialização. Essa questão parece estar refletida nas manifestações de Lima e Bellaver (2000), que destacam o controle de pontos críticos na fase de pré-processamento, como a colheita, a limpeza, a secagem, a armazenagem e o transporte, o que pode contribuir para a melhoria da qualidade do milho para a alimentação animal e para a redução dos problemas com micotoxinas, ataque de insetos, baixo valor nutritivo, quebra de grãos, contaminação por agrotóxicos e presença de impurezas.

A incidência mais elevada de grãos ardidos nas regiões em estudo foi de 11,08% no silo Lodi (Tabela 7) e de 4,20% no silo da Cotrel (Tabela 8). Esses são os valores mais elevados, considerando os dois locais dos experimentos separadamente. O híbrido n.º 9, que apresentou 11,08% de incidência de grãos ardidos, teve um rendimento de 9.600 kg/ha, com lavoura irrigada e implantada no sistema de monocultura. O rendimento alcançado pelo híbrido n.9 - XL 212 pode estar associado à população de plantas, caso tenha sido elevada, acima da recomendada, que é de cinquenta a sessenta e cinco mil plantas por hectare de acordo com a literatura, favoreceu a incidência de fungos agentes causais da podridão de espigas e de grãos ardidos. Buscando amparo para essas especulações, cita-se Trento (2000), que relata o aumento da incidência de podridões de espigas à medida que se eleva a população de plantas; o aumento de cinquenta para setenta mil plantas por hectare incrementou em 5% a incidência de grãos ardidos.

Os valores da incidência de GA podem estar relacionados com os diferentes tipos de manejo com que as lavouras de milho foram conduzidas.

TABELA 8- Médias percentual de grãos normais (GN), grãos com injúria mecânica visível (IMV) e incidência de grãos ardidos (GA) de híbridos comerciais coletados na recepção dos silos da cooperativa Cotrel. A média representa sete híbridos de lavouras comerciais. C V% = 1,64 (GN); C V% = 13,53 (GA); C V% = 7,91(IMV). Safra 99/00.

N.º híbrido ¹	Híbridos	N.º híbrido ¹	GN	N.º híbrido ¹	GA	N.º híbrido	IMV
1	P 0F33	7	89,23 ² a ³	3	4,20 ² a ³	6	17,65 ² a ³
2	C 805	5	85,95 b	4	3,52 b	4	16,53 b
3	AG 122	3	85,28 b	6	2,40 b	2	14,28 b
4	Z 8392	1	83,95 c	2	2,18 c	1	14,25 b
5	XL 212	2	83,33 c	7	1,65 c	5	12,50 b
6	C 505	4	80,15 d	1	1,50 c	3	10,40 c
7	P 30F80	6	79,65 d	5	1,43 d	7	8,88 c

¹- Número de híbrido que corresponde ao nome comercial na tabela; ²- médias de quatro repetições de 250g de grãos de um mesmo híbrido; ³- As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

De acordo com a Tabela 7, os híbridos que apresentaram maior incidência de grãos ardidos estão agrupados de “a” - “c” pelo teste Scott-Knott e foram cultivados pelo sistema plantio direto (Tabela 1). Nesse sistema, os restos culturais do milho permanecem na superfície do solo, em condições nas quais a velocidade de decomposição é mais lenta, o que, conseqüentemente, aumenta o período de sobrevivência dos patógenos necrotróficos durante a fase saprofítica (Reis & Casa, 1996).

Os híbridos das médias de “b” a “d” (Tabela 9) apresentaram incidência tolerável quando comparados com híbridos avaliados por Trento (2000), que relatou a incidência de 27,29% em lavouras de monocultura e de 18,13% em lavouras com rotação de cultura na safra

97/98, e, respectivamente, de 7,18% e 3,51% de incidência na safra 98/99.

Os híbridos de ciclo precoce do experimento da EAFS, cultivados em rotação de cultura, população de cinquenta mil plantas/ha, plantio direto e cobertura de verde de aveia preta, apresentaram variações na incidência de GA. Dessa forma, os resultados sugerem que a incidência pode estar relacionada com a tolerância dos genótipos ao ataque de fungos patogênicos.

As diferenças entre os híbridos do experimento apontam que os genótipos SHS 8447, n.º 4, com 6,28%, e o TORC, n.º 6, com 4,55% de incidência, são os mais suscetíveis ao ataque de agentes causais das podridões de espigas. Os híbridos das médias de “c” a “h”, agrupados pelo teste de comparação de Scott-Knott, apresentaram incidências relativamente baixas e devem ser mais tolerantes ou resistentes ao ataque de fungos patogênicos. Essa variação de comportamento de híbridos frente às doenças é normal, conforme Programa... (1999).

O teor da umidade dos grãos (Tabela 9) determinado no momento da coleta, que ocorreu simultaneamente à colheita, apresentou variação entre os híbridos, apesar de todos serem de ciclo precoce. A umidade mais elevada foi de 24,02%, e a mais baixa, de 15,51%, respectivamente, para os híbridos Dina 657 e AG 6016. Pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, foram revelados 12 níveis diferentes de umidade, sendo provável que essas diferenças não estejam relacionadas com o ciclo do híbrido. Dessa forma, a identificação do híbrido pelo ciclo a que pertence não oferece segurança para o planejamento da semeadura, combinado com a época de colheita. Essa

variação estatística significativa na redução da umidade dos híbridos provavelmente foi de origem genética.

TABELA 9- Médias de incidências de grãos ardidos (GA) e a variação da perda do teor de umidade (%) dos híbridos precoces cultivados no experimento da lavoura experimental da Escola Agrotécnica Federal de Sertão (EAFS). Os resultados representam a média de híbridos cultivados pelo sistema plantio direto sobre cobertura verde de solo, aveia preta. C V % = 9,20 (GA). Safra 99/00.

N. híbrido ¹	Híbridos	N. híbrido	GA	N. híbrido	Umidade (%)
1	C 833	4	6,28 ² a ²	10	24,02 a ³
2	Premium	6	4,55 b	7	21,07 b
3	C 813	11	3,86 c	2	20,25 c
4	SHS 8447	13	3,65 c	13	20,25 c
5	Dina 766	12	3,56 c	6	20,14 d
6	TORK	9	3,16 d	12	19,53 e
7	AS 3466	2	2,05 e	3	19,42 f
8	AG 600	10	2,00 e	9	19,32 g
9	Al25 Var	7	1,94 e	11	18,49 h
10	Dina 657	5	1,61 f	4	18,29 i
11	P 33F33	8	1,50 f	1	17,98 j
12	AS 523	14	1,10 g	5	16,74 k
13	P 32R21	1	0,80 h	8	15,51 l
14	AG 2288	3	0,67 h	n. p ⁴ .	

¹- Número de híbrido que corresponde ao nome comercial na tabela; ²- médias de quatro repetições de 250 g de grãos de um mesmo híbrido; ³ - Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo testes de Scott-Knott a 5% de probabilidade; n. p⁴. - não precoce.

5.4. CONCLUSÕES

De acordo com a abordagem utilizada e os resultados obtidos, pode-se considerar que:

a) os métodos de controle cultural influenciaram na qualidade comercial dos grãos de milho produzidos nas lavouras das regiões do Planalto Médio e do Alto Uruguai do Rio Grande do Sul na safra 99/2000;

b) a incidência de GA e os percentuais de GN e de grãos com IMV, de acordo com os padrões de classificação do comércio, influenciaram na qualidade comercial do milho;

c) a baixa umidade dos grãos na colheita, associada à regulagem da colhedora, influenciou no percentual de IMV;

d) os híbridos de ciclo precoce responderam diferentemente à perda de água no campo.

5.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALMER, E.; PEREIRA, O.P. Doenças de milho. In: PARTENIANI, E.; VIEGAS, G.P. (Org.) **Melhoramento e produção de milho**. 2.^a ed. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 595-634.

BERGAMIN FILHO, A. Avaliação de danos e perdas. In: BERGAMIN, FILHO, A; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Eds.) **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Ceres, 1995. v. 1, p. 672-690.

BRANDALIZZE, V. Milho no contexto mundial. In: BORGES, G. & BORGES, L.D (Org.) SEMINÁRIO SOBRE TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DE MILHO. 2000, Passo Fundo. **Artigos...**, Passo Fundo: Aldeia Norte, 2000. p. 127-135.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Portaria n. 11 de 12 de abril de 1996. Critérios complementares para classificação do milho. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.72, p.6231, 15 de abril 1996. 1996. Seção I.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Defesa Vegetal. Coordenação de Laboratório vegetal. **Regras para a análise de sementes**. Brasília: CLAV, 1992. 365p. Cap. 9: Teste de sanidade de sementes.

CASA, R.T; REIS, E.M.; ZAMBORLIM, L. Fungos associados à semente de milho produzida nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 370-373, 1998.

COTTEN, T.K.; MUNKVOLD, G.P. Survival of *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans* in maize stalk residue. **Phytopathology**, Saint Paul, v.88, p. 550-555, 1998.

DOWSWELL, C.R.; PALIWAL, R.L.; CANTRELL, R.P. **Maize in the third world**. Oxford: Westview Press, 1996. 244p.

EICHELBERGER, L. **Secagem e armazenamento de grãos**: manual de treinamento. Porto Alegre: SENAR/AR-RS, 2000. 72p. Cap. 1: A qualidade dos grãos.

FANCELLI, A.L. Fisiologia da produção e aspectos básicos de manejo para o lato rendimento. In: BORGES, G.; BORGES, L. D. (Org.) SEMINÁRIO SOBRE TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DE MILHO. 2000, Passo Fundo. **Artigos...**, Passo Fundo: Aldeia Norte, 2000. p.101-106.

FLETT, B.C.; McLAREN, N.W. Optimum disease potencial for evaluating resistance to *Stenocarpella maydis* ear rot in corn híbrids. **Plant Disease**, Saint Paul, v.78, p.587-589, 1994.

FLETT, B.C; WEHNER, F.C. Incidence of *Stenocarpella* and *Fusarium* cob rots in monoculture maize under deferent tillage systems. **Journal of Phytopathology**, Saint Paul, v.133, p.327-333, 1991.

FONSECA, H. Fatores que influem na ocorrência de micotoxinas em milho. In: MOLIN, R.; VALENTINI, M.L. (Orgs.) SIMPÓSIO SOBRE MICOTOXINAS EM GRÃOS. 1999. Ponta Grossa. **Artigos...**, São Paulo: Fundação Cargill/Fundação ABC, 1999. p.9-20.

HESELTINE, C.W.; ROGERS, R.F.; SHOTWELL, O.L. Aflatoxin and mould flora in North Carolina in 1977 corn crop. **Mycologia**, New York, v. 73, p. 216-228, 1977.

KEDERA, C.J.; LESLIE, J.F.; CLAFLIN, L.E. Systemic infection of corn by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.82, p.1138, 1992.

KING, S.B. Time of infection of maize kernels by *Fusarium moniliforme* and *Cephalosporium acremonium*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.71, n.8, p.796-799, 1981.

KLAPPROTH, J.C.; HAWK, J.A. Evaluation of four inoculation techniques for infecting corn ears with *Stenocarpella maydis*. **Plant Disease**, Saint Paul, v.75, p.1057-1060, 1991.

LIMA, G.J. M.M. de; BELLAVER, C. Milho de qualidade superior na alimentação de suínos e aves. In: BORGES, G.; BORGES, L.D. (Org.) SEMINÁRIO SOBRE TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DO MILHO. 2000, Passo Fundo. **Artigos...**, Passo Fundo: Aldeia Norte, 2000. p.86-100.

LUZ, W.C.da. **Diagnose e controle das doenças da espiga de milho no Brasil**. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1995. 28p. (Circular Técnica, 5).

MACHADO, J.A. Melhoramento genético de cereais visando micotoxinas. In: MOLIN, R.; VALENTINI, M.L. (Orgs.) SIMPÓSIO SOBRE MICOTOXINAS EM GRÃOS. 1999, Ponta Grossa. **Artigos...**, São Paulo: Fundação Cargill/Fundação ABC, 1999. p. 41-55.

MANTOVANI, E.C. **Colheita mecânica, secagem e armazenamento do milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1989. p.01-24.

MARASAS, W.F.O.; KRIEK, N.P.J. WIGGINS, V.M. STEYN, P.S.; TOWERS, D.K.; HASTIE, T.J. Incidence, geographical distribution and toxigenicity of *Fusarium* species in South African corn. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, p. 1181-1195, 1979.

McGEE, D.C. **Maize Diseases: a reference source for seed technologists**. Saint Paul: The American Phytopathological Society. 1988. 150p.

MUNKVOLD, G.P.; DESJARDINS, A.E. Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence? **Plant Disease**, Saint Paul, v.81, p.211-216, 1997.

MUNKVOLD, G.P.; McGEE, D.C.; CARLTON, W.M. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, p. 209-217, 1997.

PEREIRA, O.A.P. Situação atual de doenças da cultura do milho no Brasil e estratégias de controle. In: **Resistência genética de plantas a doenças**. Piracicaba: ESALQ/USP, Departamento de Genética, 1995. p. 25-30.

PROGRAMA MULTIINSTITUCIONAL DE DIFUSÃO DE TECNOLOGIA EM MILHO DO RS. **Recomendações técnicas para a cultura de milho no Estado do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: FEPAGRO/RS; EMATER/RS; FECOAGRO/RS, 1999. 144p., (Boletim técnico, n.º 6).

REID, L.M.; BOLTON, A.T.; HAMILTON, R.I.; WOLDEMARIAM, T.; MATHER, D.E. Effect of silk age on resistance of maize to *Fusarium graminearum*. **Can. J. Plant Pathology**, Ottawa, v.14, p.293-298, 1996.

REIS, E.M.; CASA, R.T. **Manual de identificação e controle de doenças de milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 1996. 80p.

REIS, E.M.; DENTI, E.A.; TRENTO, S.M.; CASA, R.T.; SEVERO, R. Método para quantificar danos no rendimento de grãos causados pelas podridões da base do colmo do milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23, p.300, 1998. (Resumo).

RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O.; Van WYK, P.S. Fungal associations in corn kernels and effects on germination. **Phytopathology**, Saint Paul, v.80, p.131-134, 1990.

SANDINI, I.E.; WOBETO, C. **Milho & Soja**. Gurapuava: FAPA - Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária, 1998. p.167-194.

SHURTLEFF, M.C.A **compendium of corn diseases**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1992. 105p.

SMITH, D.R. & WHITE, D.G. **Corn and Corn improvement**. 3.ed. Madison: American Society Agronomy, 1988. 986p. Cap. 12: Diseases of corn.

TRENTO, S.M. **Quantificação de danos causados por podridões de espiga e de grãos ardidos em milho, em diferentes sistemas de manejo de plantas**. Passo Fundo, 2000. 70p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo. Passo Fundo, 2000.

ULLSTRUP, A.J. Observations on two ephiphytotics of *Diplodia ear rot* of corn in Indiana. **Plant Disease**, Saint Paul, v.48, p.414-415, 1964.

WHITE, D.G. Preharvest mycotoxins in corn: an overview. In: ANNUAL ILLINOIS CORN BREEDERS SCHOOL. 30, Champaign. **Summary...**, Champaign: University of Illinois at Urbana, 1994. p.1-6.

ZUMMO, N.; SCOTT, G. E. Interaction of *Fusarium moniliforme* and *Aspergillus flavus* on kernel infection and aflatoxin contamination in maize ears. **Plant Disease**, Saint Paul, v.76, p.771-773, 1992.

CAPÍTULO VI

FUNGOS E MICOTOXINAS EM GRÃOS DE MILHO ARMAZENADOS A GRANEL COM DIFERENTES GRAUS DE UMIDADE

6.1. INTRODUÇÃO

O milho, por ser uma das principais espécies vegetais exploradas pelo homem, tanto que, anualmente, são cultivados cerca de 140 milhões de hectares, no mundo, resultando numa produção de mais de seiscentos milhões de toneladas de grãos, é utilizado na forma *in natura* na alimentação de animais e humana e, na indústria, é empregado como matéria-prima na produção de amido, óleo, farinha, glicose, produtos químicos, rações animais e na elaboração de formulações alimentícias. Contribui com 15% do total de proteínas e 19% das calorias produzidas anualmente no mundo (Pinazza, 1993; Dowswell et. al., 1996; Brandalitze, 2000; Fancelli, 2000)

Lima & Bellaver (2000) apontam que o controle dos pontos críticos na fase de pré-processamento, como a colheita, a limpeza, a secagem, a armazenagem e o transporte, pode contribuir para a melhoria

da qualidade nutritiva dos grãos, por reduzir a incidência de fungos toxigênicos produtores de micotoxinas, o carunchamento, a quebra de grãos, a degradação de nutrientes, a contaminação por agrotóxicos e a presença de impurezas.

Para Mantovani (1989) e Eichelberger (2000), a colheita mecanizada do milho deve ser realizada quando o teor de umidade dos grãos estiver entre 18 e 26%.

A secagem é uma das operações mais importantes do processamento dos grãos, razão pela qual deve ser controlada para se obter uma umidade final adequada, com um mínimo de dano mecânico nos grãos e a manutenção de suas qualidades nutritivas e comerciais. Fatores biológicos podem influenciar na performance da secagem de grãos (Mantovani & Fontes, 1989; Bakker-Arkema, 1993; Eichelberger, 2000).

A manutenção da qualidade dos grãos durante o armazenamento depende de alguns fatores, como teor de umidade inferior ao índice de crescimento dos fungos de armazém; umidade relativa do ar em equilíbrio com a umidade da massa de grãos; temperatura da massa de grãos constante; baixo percentual de grãos danificados; remoção das impurezas acumuladas e manutenção da umidade relativa intergranular entre 65-70% e umidade dos grãos entre 13-14,5% (Lazzari, 1997; Weber, 1998; Programa...,1999).

A aeração é fundamental para a manutenção de um ambiente controlado no armazenamento dos grãos e para evitar que ocorram danos à

sua qualidade e quantidade. Deve ser usada sempre que forem constatados pontos na massa de grãos com diferenças de temperaturas iguais ou maiores de 6 °C e quando for constatada uma temperatura média igual ou superior a 6 °C em relação à temperatura ambiente (Weber, 1998).

O armazenamento a granel representa algumas vantagens, entre as quais se destacam a economicidade, pela menor necessidade de mão-de-obra e eliminação do custo da sacaria, e praticidade no uso da aeração, o que permite a conservação dos grãos por longos períodos, sem perdas e sem alterações significativas na sua qualidade (Eichelberger, 2000).

De acordo com Márcia & Lazzari (1998), fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são encontrados em armazéns, moinhos, silos, moegas, elevadores, equipamentos e lugares onde são armazenados, manuseados e processados produtos agrícolas

O armazenamento de grãos de milho com 13% de umidade em ambiente com 15 °C e 61% de umidade relativa do ar oferece condições seguras para evitar a produção de aflatoxinas por fungos do gênero *Aspergillus* (Lazzari, 1997).

De acordo com Schmidt & Esser (1985), as aflatoxinas produzidas pelos fungos *A. flavus* e *A. parasiticus* são consideradas as substâncias naturais com maior potencial carcinogênico. Apesar de sua importância médica e econômica, nos países do Terceiro Mundo não existem dados conhecidos sobre métodos efetivos de controle, em virtude da ausência de pesquisas na área da micotoxicologia..

As espécies *A. flavus*, e *A. parasiticus* são produtores das toxinas mais importantes do gênero, denominadas aflatoxinas. Algumas cepas ou raças de *A. flavus* não são toxigênicas, ao passo que outras têm a habilidade de produzir aflatoxinas B1 e B2. O *A. parasiticus* produz as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, com maior estabilidade de biossíntese em relação ao *A. flavus*. A aflatoxina B1 é a substância natural que possui o maior grau de toxicidade para animais, seguida de M1, G1, B2 e G2. O milho é um dos produtos mais afetados pelas aflatoxinas (Schmidt & Esser, 1985; Cruz, 1995; Gourama & Bullerman, 1995).

A ocratoxina A foi a primeira substância descoberta do grupo das ocratoxinas. É considerada o constituinte mais tóxico do grupo, com potencial carcinogênico, e foi isolada de uma linhagem de *A. ochraceus* e, posteriormente, de espécie do gênero *Penicillium* (Marquardt & Frohlic, 1992; Cruz, 1995; Kuiper-Goodman, 1996).

A umidade dos grãos de milho é um fator determinante para o desenvolvimento de *Fusarium* spp. e a produção da micotoxina zearalenona. Entre as espécies produtoras destacam-se o *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. sambucinum*, *F. solani* e *F. sporotrichoides* (Sherwood & Peberdy, 1974; Joffe, 1986). A zearalenona causa hiperestrogenismo em suínos, reduz a fertilidade do rebanho leiteiro (Coulombe, 1993; Whitlow & Hagler Jr., 1999) e altera a idade em que as crianças atingem a puberdade (Miller, 1995).

A esterigmatocistina produzida pelas espécies *A. rugulosus*, *A. versicolor*, *A. nidulans* tem sido encontrada em grãos de cereais (Mills & Abramson, 1986; Soares 1987) e foi associada com diarreia sanguinolenta e morte de animais (Vesender & Horn, 1985).

Há necessidade de se obter mais informações a respeito da incidência de fungos toxigênicos e da presença de micotoxinas em grãos em decorrência do atraso da colheita e do armazenamento a granel com diferentes teores de umidades. Por essa razão o estudo objetivou avaliar a incidência de fungos toxigênicos, a presença de micotoxinas relacionada com a variação do teor de umidade dos grãos no decorrer das coletas na lavoura e durante o armazenamento de grãos com diferentes graus de umidade, sob a hipótese de que o retardamento da colheita do milho, o grau de umidade e o período de armazenamento dos grãos favorecem o desenvolvimento de fungos patogênicos e contaminação por micotoxinas.

6.2. MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Local e época

O experimento foi conduzido no laboratório de Fitopatologia do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, no Laboratório de Análises de Micotoxinas do Centro de Pesquisa em Alimentação da UPF e no Laboratório de Microbiologia Fitopatológica do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da UFRGS, no período compreendido de outubro de 1998 a julho de 2000.

6.2.2. Experimento de campo

O experimento com o milho híbrido XL 212 foi conduzido em uma área de um hectare de lavoura, com 5,8 sementes por metro e espaçamento de 0,90m entrelinhas. O cultivo foi conduzido sob sistema plantio direto, com rotação das culturas soja/nabo/milho híbrido XL 212, na safra agrícola 98/99.

O experimento de armazenamento simulado de grãos foi executado em uma sala ventilada com área de 3,0m x 4,0m, no departamento de Fitopatologia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária de UPF. Bombonas de plástico com cerca de 28 kg de grãos de milho constituíram os cinco tratamentos do experimento. As bombonas foram distribuídas sobre um estrado de madeira com a altura de 0,7m.

6.2.3 Amostragem de grãos

As amostras de grãos que constituíram os tratamentos da armazenagem simulada foram obtidas empregando-se o método de amostragem desenvolvido por Reis et al. (1998), o qual consistiu de escolha aleatória simples de cinco pontos distribuídos eqüidistantes dentro da área do experimento da lavoura. Foram coletadas todas as espigas de milho numa extensão de 10 m de uma fila com 5,8 plantas por metro. As espigas foram coletadas e despalhadas manualmente e debulhadas com trilhadeira no laboratório.

Foram realizadas cinco coletas a intervalos de oito dias, com diferentes teores de umidade nos grãos e iniciaram com umidade de 20,5%, estendendo-se por cerca de trinta dias.

Após o processamento das amostras, foram determinados o teor de umidade, a incidência de fungos patogênicos e a presença de micotoxinas nos grãos.

6.2.4. Armazenamento simulado

Foram constituídos seis tratamentos de grãos, os quais antes de serem armazenados, foram submetidos a secagem em sala climatizada, com temperatura regulada para 34 °C, aquecida por calefator de ar quente com ventilação.

As amostras obtidas das coletas da lavoura, com cerca de 28 kg de grãos, após secagem foram submetidas ao armazenamento simulado, pelo período de um ano, em bombonas de plástico com capacidade para volume de 35kg. O tratamento foi constituído pelos grãos da amostra armazenados na bombona que, foi vedada com a tampa, e esta, por sua vez, foi selada com fita adesiva.

Após a secagem, os grãos foram armazenados conforme a descrição a seguir:

1ª. coleta - a umidade de coleta dos grãos foi de 20,5%. Nesta coleta, foram obtidas duas amostras e foram armazenados dois

tratamentos, sendo um com 19,0% e o outro com 13,0% de teor de umidade nos grãos;

2ª. coleta - a umidade de coleta dos grãos foi de 19,5% e foi armazenado um tratamento com teor de umidade de 17,5%;

3ª. coleta - a umidade de coleta dos grãos foi de 17,8% e foi armazenado um tratamento com teor de umidade de 15,0%;

4ª. coleta - a umidade coleta dos grãos foi de 17,6% e foi armazenado um tratamento com teor de umidade de 13,5%;

5ª. coleta - a umidade coleta dos grãos foi de 17,7% e foi armazenado um tratamento com teor de umidade de 12,5%.

Os grãos dos tratamentos foram avaliados a intervalos de três meses, quando eram determinados o teor de umidade, a incidência de fungos e a presença de micotoxinas.

6.2.5 Amostragem dos grãos armazenados

O sistema de amostragem recomendado no Brasil e utilizado pelo Ministério da Agricultura, segundo Fonseca (1991), propõe a amostragem com um expoente fracionário para a rejeição ou aceitação de lotes de amendoim, arroz, milho, etc.

Os grãos do tratamento, inicialmente, foram homogeneizados e, após, procedeu-se à retirada de 15 subamostras de 100g, que formaram a amostra. A amostra foi partida em três subamostras, as quais foram processadas individualmente na avaliação da incidência de fungos

patogênicos, na análise de micotoxinas, e a terceira para a confirmação dos resultados.

6.2.6 Determinação da umidade dos grãos

A umidade dos grãos foi determinada com medidor de umidade portátil marca Multi-Grain, modelo 46233-12, série 1233-10542, manufaturado por Dickey - Jhon Corporation - Auburn, Yllinois - EUA.

6.2.7 Incidência de fungos patogênicos

Das amostras de grãos coletadas foi extraída uma subamostra laboratorial, que foi desinfestada. Inicialmente, foi imersa em etanol a 70% por um minuto; em seguida, em solução de hipoclorito de sódio a 2%, por um tempo de dois minutos, e, por fim, foi enxaguada duas vezes em água destilada e esterilizada. Os grãos foram dispostos em placa de petri contendo meio de cultura um quarto de BSA + A (50 g de batata, 5 g de sacarose, 20 g de ágar e 500 ppm de sulfato de estreptomicina) por litro de meio de cultura. Cada placa de petri continha cerca de 20 g de meio de meio de cultura. As placas com os grãos de milho foram incubadas em câmara de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas por um período de cinco a sete dias.

As incidências de fungos associados aos grãos foram obtidas a partir de uma amostra composta de quatro subamostras (repetições) de cem grãos (Brasil, 1992). Os grãos foram plaqueados num arranjo

experimental de quatro repetições de vinte placas com cinco grãos e incubados em câmara de crescimento. Após o crescimento, com auxílio de lupa estereoscópica e microscópio ótico, procedeu-se à identificação dos fungos.

Os resultados foram expressos em incidência média de fungos, resultante da média aritmética das quatro repetições. As médias de incidência obtidas em números absolutos foram convertidas em valores relativos.

6.2.8 Análise de micotoxinas

O método utilizado para a determinação das micotoxinas foi cromatografia em camada delgada. A preparação de solução de estoque dos padrões e a determinação exata da concentração seguiram a metodologia descrita em Scott (apud AOAC, 1997) item 971.22. Os processos de extração, clarificação e concentração do estrato seguiram a metodologia desenvolvida por Soares (1987) para determinação simultânea das micotoxinas: aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, ocratoxina A, zearalenona e esterigmatocistina (AOAC, 1997), itens 982.24, 982.25 e 982.26.

Realizou-se a triagem das micotoxinas em todas as amostras; após, as que apresentaram resultados positivos foram submetidas à confirmação por cromatografia em camada delgada bidirecional. A quantificação foi realizada por comparação visual da intensidade de

fluorescência da mancha-amostra com a fluorescência da mancha das alíquotas dos padrões aplicados (Patterson & Roberts, 1979).

Os limites de detecção do método para a quantificação das amostras foram: aflatoxinas - B₁: 3 (µg/kg); B₂: 2 (µg/kg); G₁: 3 (µg/kg) e G₂: 2 (µg/kg), zearalenona: 527,04 (µg/kg), ocratoxina A: 76,48 (µg/kg), esterigmatocistina: 84,8 (µg/kg).

Foi utilizada a metodologia de Scott (1991) para confirmar as aflatoxinas B₁ e G₁. Para a confirmação de ocratoxina A e zearalenona, foi aplicada a metodologia de Golinski & Grabarkiewicz-Szczena (apud AOAC, 1997). A confirmação da esterigmatocistina seguiu a metodologia oficial da AOAC (1997), item 973.38.

Extratos de grãos de milho foram utilizados nas análises das micotoxinas por cromatografia de camada delgada (CCD) em cromatofolhas de alumínio com camada de silicagel 60, 20 x 20.

Padrões de aflatoxinas B₁ (A 6636), B₂ (A9026), G₁ (A0138), G₂ (A9151); ocratoxina A (O1877); esterigmatocistina (S3255) e zearalenona (Z2126).

Soluções padrões de trabalho de aflatoxinas [B₁ (0,5(g/g)); [B₂ 0,1(g/g)]; [G₁ (0,5(g/g)] e [G₂ 0,1(g/g)], ocratoxina A [4,79(g/g)], zearalenona [54,9(g/g)] e esterigmatocistina [5,3(g/g)].

Todos os reagentes utilizados foram p.a.

6.2.9 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental completamente casualizado (DCC) foi constituído pelo volume de cerca de 28 kg de grãos contidos em bombonas de plástico, em armazenagem simulada, com seis tratamentos e quatro repetições para cada determinação e avaliação, caracterizadas por unidades experimentais, realizadas a intervalos de três meses.

Os resultados foram submetidos à técnica de análise variância simples a 5% de probabilidade, pelo teste F de significância e análise de regressão polinomial.

Utilizou-se o programa computacional Sistema de Análise de Variância, versão 3.02 - SISVAR.

6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1. Incidências de fungos patogênicos

As curvas de regressão revelaram pequeno crescimento das espécies de *Aspergillus* spp (Aspspp) ($R^2 = 0,53$) e *Penicillium* spp (Penspp) ($R^2 = 0,63$) em grãos armazenados com teor de umidade de 13% (Figura 1). Tais resultados revelam que esses microrganismos demonstraram a habilidade de manter o metabolismo ativo ao longo do período de armazenamento, embora os grãos apresentassem nível baixo de umidade permanecendo na forma de micélio dormente. Dessa forma, a reduzida incidência pode ser atribuída à influência da baixa umidade de

armazenamento dos grãos, que gerando condições inadequadas para o desenvolvimento.

As espécies de *Cephalosporium* spp.(Ceph spp) mantiveram a atividade fúngica elevada, sugerindo que estes fungos têm possibilidade de desenvolver seu micélio no interior do grão sem causar danos e sintomas aparentes mesmo em condições de baixa umidade dos grãos.

As espécies consideradas de campo, do gênero *Fusarium*, tiveram sua incidência reduzida com o passar do tempo de armazenamento, sugerindo que não encontraram condições favoráveis para desenvolver a atividade metabólica plena. O grau de umidade e o período de armazenamento, de acordo com as equações de regressão para *F. moniliforme* ($R^2 = 0,82$) e para *F. graminearum* ($R^2 = 0,92$), podem ter sido os fatores que mais influenciaram na perda da viabilidade dos propágulos desses fungos. Outro aspecto a ser considerado são as estruturas de resistência. Estas não serem adaptadas a obter nutrientes de substratos em ambientes fechados e com reduzida umidade e redução na contração de oxigênio e com aumento de dióxido de carbono, podem ter contribuído para a queda da incidência desses patógenos.

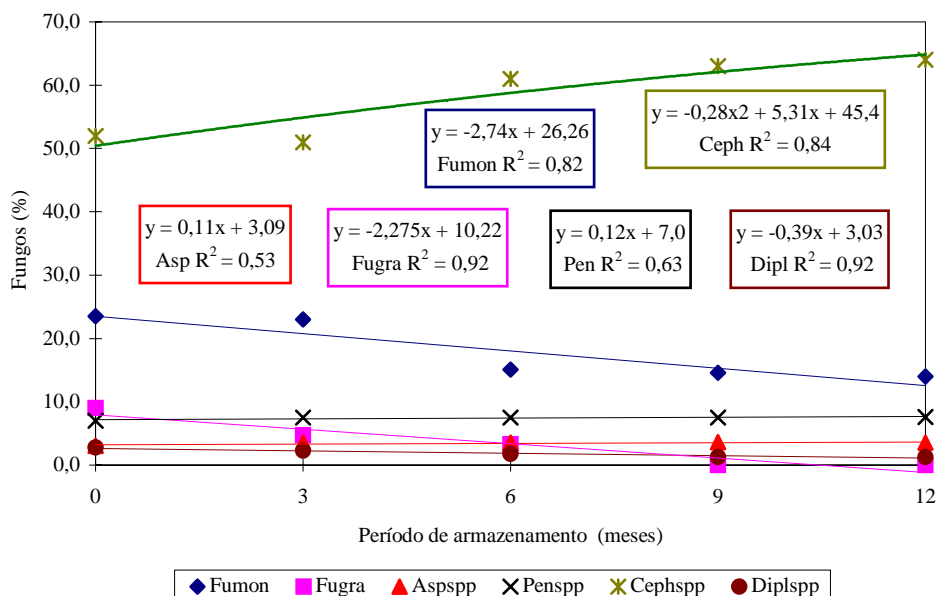


FIGURA 1. Relação entre período de armazenamento de grãos de milho com 13,0% de umidade e a incidência de fungos patogênicos, avaliada a intervalos de três meses durante um ano. Safra 98/99.

Nos grãos armazenados com umidade inicial de 19,0% (Figura 2), as avaliações sugerem que os fatores umidade e período de armazenamento influenciaram na elevação da incidência das espécies de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. A incidência desses fungos elevou-se à medida que o período de armazenamento transcorreu, em decorrência do elevado grau de umidade dos grãos.

Observa-se, que, a partir de três meses de armazenamento, esses fungos começaram a crescer e a se desenvolver com maior rapidez e, ao final do período da avaliação de doze meses, os fungos das espécies *Penicillium* spp. alcançaram a incidência de 47,5 % e as espécies de *Aspergillus* spp. 24,0 %; o grau de umidade dos grãos se elevou para 25,4

% (Tabela 1). Esses resultados conferem com os obtidos por Lazzari (1997), que relata a elevação do teor de umidade em consequência do metabolismo dos fungos e da respiração dos grãos em virtude do consumo da massa do substrato colonizado, que foi transformado em energia, necessária para o patógeno, além de gás carbônico e água.

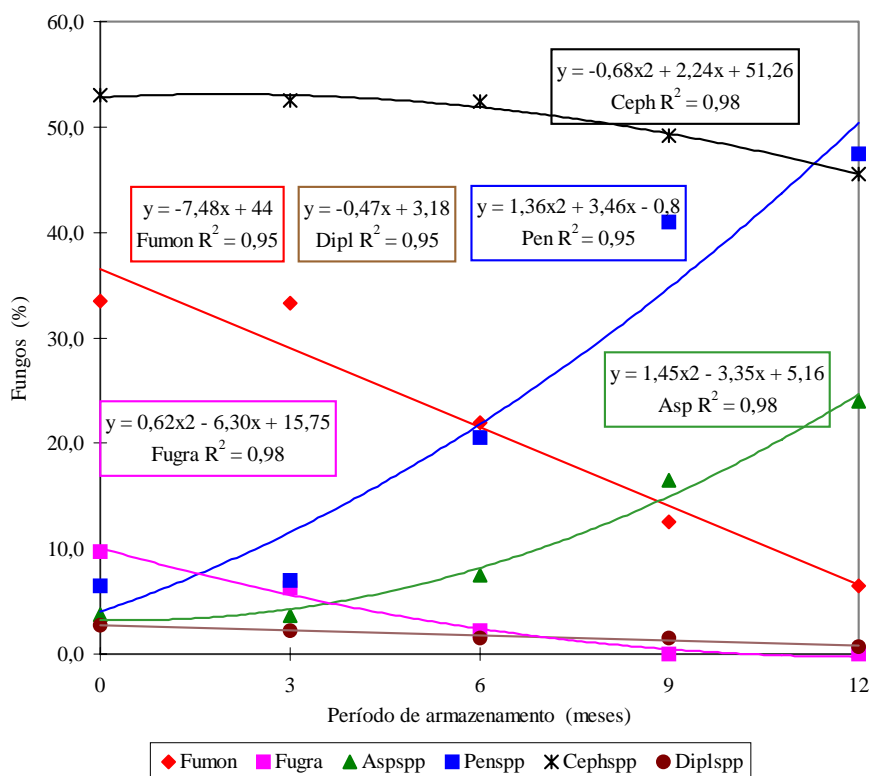


FIGURA 2. Relação entre o período de armazenamento de grãos de milho com 19,0% de umidade inicial e a incidência de fungos patogênicos avaliada a intervalos de três meses durante o um ano. Safra 98/99.

As espécies de *Cephalosporium* spp. foram detectadas no decorrer de todo o período de avaliação, sugerindo que não sofreram influência da elevação da incidência dos fungos *Aspergillus* e *Penicillium* e da umidade relacionada com o tempo de armazenamento dos grãos.

De acordo com as Figuras 2 e 3, as espécies do gênero *Fusarium* demonstraram redução de incidência à medida que transcorria o tempo de armazenamento, e a umidade elevou-se em razão do crescimento dos fungos *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., que prevaleceram sobre outras consideradas de campo.

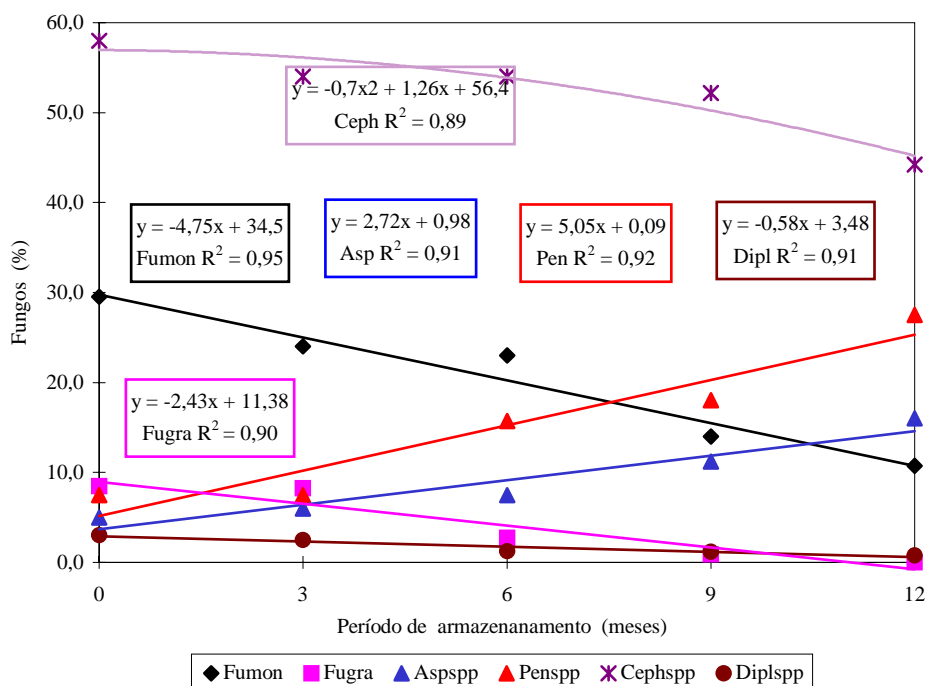


FIGURA 3- Relação entre o período de armazenamento de grãos de milho com 17,5% de umidade inicial e a incidência de fungos patogênicos avaliada a intervalos de três meses durante um ano. Safra 98/99.

De acordo com a Figura 3, os fungos das espécies *Cephalosporium* spp. apresentaram incidência elevada com pequena queda no decorrer do tempo de armazenamento, revelando redução da viabilidade do inóculo. Essa resposta pode ser associada à elevação do crescimento dos fungos das espécies de *Aspergillus* spp. e *Penicillium*

spp., que, aos nove meses de armazenamento, apresentaram a incidência, respectivamente, de 11,20% e 18,0%, e, ao final dos 12 meses, de 16,0% e 27,5% (Tabela 1).

Na Figura 4, estão representados os valores referentes à incidência de fungos em grãos armazenados com umidade inicial de 15% e avaliados a intervalos de três meses. Nesse grau de umidade, a espécie *F. moniliforme* apresentou, no início do armazenamento, 30,0 % de incidência, e ao final de 12 meses, 19%; *F. graminearum* revelou incidência zero na última avaliação.

Essas reduções de incidência podem estar relacionadas com o grau de umidade dos grãos, o tempo armazenamento, a redução de oxigênio e a elevação de dióxido de carbono, que não ofereceram condições para a manutenção da viabilidade do inóculo.

A atividade dos fungos *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. foi reduzida e a umidade de armazenamento não sofreu alteração ao longo dos 12 meses de avaliação (Tabela 1).

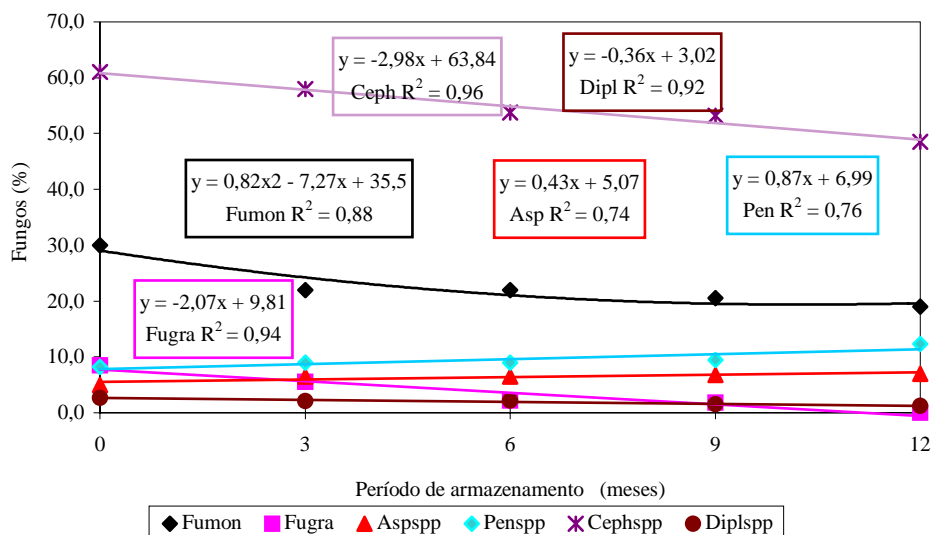


FIGURA 4- Relação entre o período de armazenamento de grãos de milho com 15,0% de umidade inicial e a incidência de fungos patogênicos avaliada a intervalos de três meses durante um ano. Safra 98/99.

As espécies de *Cephalosporium* spp., conforme a Figura 5, demonstraram estabilidade do inóculo e apresentaram incidência elevada que foi reduzindo lenta e linearmente. Não há relatos na literatura que possam ser relacionados com os resultados obtidos neste trabalho.

De acordo com a Figura 5, nos grãos armazenados com 13,5% de umidade, houve reduzida atividade microbiana das espécies fúngicas de armazenamento. Constatou-se que mesmo com o baixo grau de umidade, a atividade dos fungos *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp foi mantida na forma de micélio dormente. As espécies de *F. moniliforme* e de *F. graminearum* tiveram a incidência reduzida ao longo do período das avaliações.

A atividade metabólica dos fungos considerados de armazenamento, *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., não alterou a umidade dos grãos, por causa de seu reduzido crescimento. Essa resposta pode estar vinculada à afirmação de Smith & White (1988), de que tais fungos causam danos nos grãos quando os seguintes fatores os favorecem: temperatura do grão durante o armazenamento, teor de umidade do grão, umidade relativa do ar no interior do silo, potencial de inóculo de espécies de fungos presentes na massa de grãos e intensidade de injúria mecânica determinada na colheita.

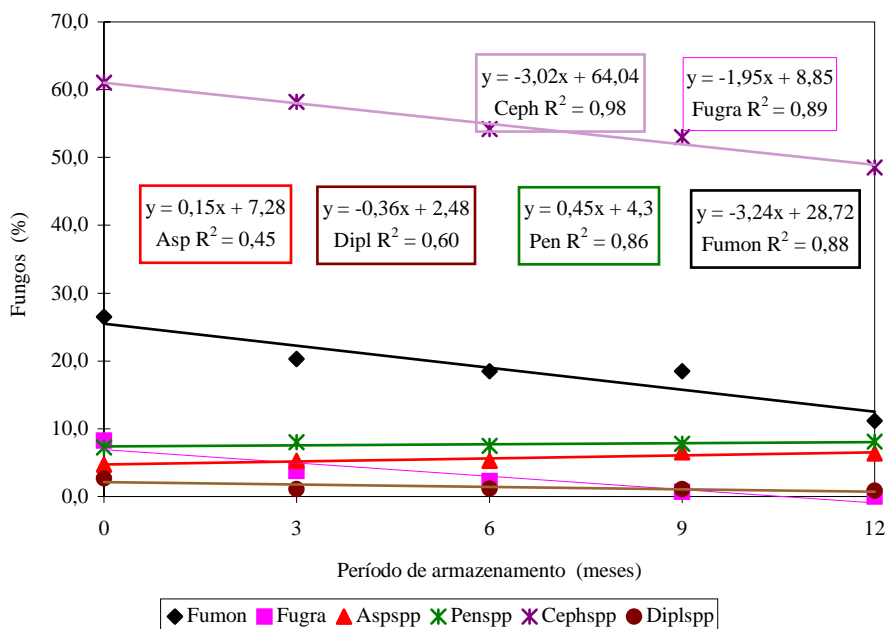


FIGURA 5- Relação entre o período armazenamento de grãos de milho com 13,5% de umidade e a incidência de fungos patogênicos, avaliada a intervalos de três meses durante um ano. Safra 98/99.

Na Figura 6, podem-se observar as respostas das avaliações de grãos coletados cerca de trinta dias após o momento ótimo de colheita e

armazenados com grau de umidade de 12,5%. Nesse tratamento, detectou-se que os fungos, demonstraram estabilidade e ou redução de incidência de acordo com as equações de regressão.

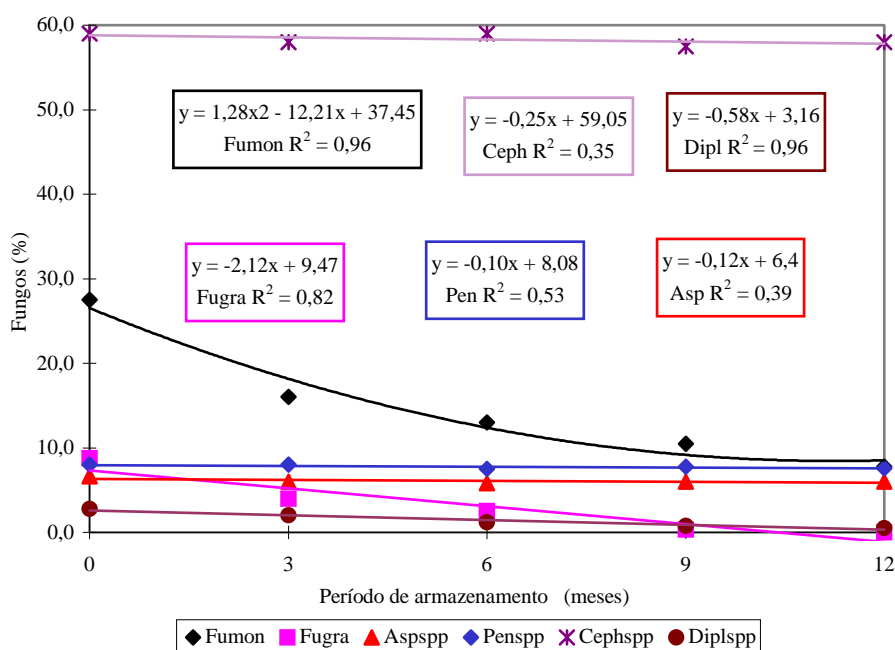


FIGURA 6- Relação entre o período de armazenamento de grãos de milho com 12,5% de umidade e a incidência de fungos patogênicos avaliada a intervalos de três meses durante um ano. Safra 98/99.

Essa estabilidade ou redução de incidência pode estar associada a condições ambientais adversas, pois os grãos apresentavam umidade de 12,5% a qual foi mantida constante durante o período dos 12 meses de avaliação. Isso significa que houve equilíbrio entre o grau de umidade dos grãos e a umidade interna na bombona de armazenamento, condição que mantém os propágulos dormentes e evita, por consequência, a infecção e a colonização dos grãos.

Os resultados dos tratamentos demonstraram que os grãos armazenados com 13,0% de teor de umidade (Figura 1) e coletados na época mais indicada para a colheita mecânica não ofereceram condições para o desenvolvimento dos fungos de armazenamento e por consequência os grãos não foram contaminados por micotoxinas.

6.3.2. Contaminação por micotoxinas

Os grãos armazenados com 13,0% de grau de umidade não apresentaram contaminação por micotoxinas (Tabela 1) em nenhuma das avaliações realizadas no período de um ano de armazenamento. Esses resultados são respaldados por Lazzari (1997), o qual enfatiza que o armazenamento de grãos de milho com 13,0% de umidade em ambiente com 15 °C e 65% de umidade intergranular é seguro para evitar a produção de micotoxinas por *Aspergillus* spp.

Os resultados das avaliações revelaram a contaminação pela micotoxina esterigmatocistina no tratamento com umidade inicial de 19,5% (Tabela 1). As análises detectaram a micotoxina a partir do intervalo de três meses de armazenamento e ocratoxina A na avaliação final. Pode-se observar que ocorreu, ao longo das avaliações, elevada atividade metabólica dos fungos de armazenamento, que provocaram a elevação do grau de umidade dos grãos. A elevada umidade inicial dos

grãos possivelmente influenciou no metabolismo para que tenha ocorrido a produção de micotoxinas.

Nos grãos armazenados com umidade inicial de 17,5%, foi detectada a micotoxina esterigmatocistina na última avaliação, realizada aos 12 meses de armazenamento. Os grãos, nessa avaliação, apresentavam a umidade de 19,6% ao final do período de armazenamento. A elevação da umidade foi gradual à medida que se estendeu o período de armazenamento. A umidade inicial favoreceu o crescimento dos fungos de armazenamento (Figura 3) e, provavelmente, influenciou no metabolismo da micotoxina ao final das avaliações.

Nos grãos armazenados com umidade inicial de 15,0% e 13,5%, as análises detectaram a presença da micotoxina esterigmatocistina nas amostras avaliadas no décimo segundo mês. Essas respostas sugerem que, mesmo com baixa umidade, a atividade metabólica dos fungos pode desenvolver a produção de micotoxinas em grãos armazenados por longos períodos. É provável que tenha havido influência do grau de umidade e período de armazenamento. Esses resultados podem ser relacionados com o estudo de Reis & Casa (1996), os quais observaram que os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* atuam preferencialmente em substratos cuja atividade fisiológica esteja interrompida ou em dormência, condição em que se encontravam esses grãos de milho armazenados.

Nos grãos da última coleta na lavoura foi detectado esterigmatocistina. O resultado pode ser relacionado com o retardamento da colheita do milho. Esse resultado indicou que os fungos do gênero *Aspergillus* podem produzir micotoxinas nos grãos ainda quando estes se encontram na lavoura, embora sejam considerados fungos predominantemente de armazenamento.

TABELA 1. Resultados das análises de micotoxinas obtidos para as avaliações a intervalos de três meses, combinadas com a umidade dos grãos (%) e o tempo de armazenamento. Safra 98/99.

Período de armazenamento	Grau de umidade dos grãos (%) nas avaliações					
	Micotoxinas (ppb)					
0 meses	13,0	19,0	17,5	15,0	13,5	12,5
						EST 50,9
3 meses	13,0	19,0	17,6	15,0	13,5	12,5
		EST 84,8				
6 meses	13,0	20,0	18,0	15,0	13,6	12,6
		EST 84,8				
9 meses	13,0	20,3	18,2	15,0	13,5	12,5
		EST 84,8				
12 meses	13,0	25,5	19,6	15,2	13,5	12,5
		EST 169,6	EST 50,9	EST 50,9	EST 50,9	
		OCR 76,6				

OCR.- Ocratoxina A; EST.- Esterigmatocistina.

6.4. CONCLUSÕES

O milho deve ser colhido tão logo o grau de umidade dos grãos permita a operação de colheita e secado imediatamente. Este manejo

reduz o potencial de inóculo dos fungos de armazenamento e a possibilidade de contaminação por micotoxinas, ainda na lavoura.

O retardamento de colheita dos grãos gerou condições favoráveis para o desenvolvimento de fungos patogênicos e a produção de micotoxinas pelos fungos do gênero *Aspergillus*.

O grau de umidade dos grãos e o período de armazenamento foram os fatores que mais influenciaram no desenvolvimento dos fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* e na contaminação por micotoxinas.

CAPÍTULO VII

EFEITOS DO GRAU DE UMIDADE E DO PERÍODO DE ARMAZENAMENTO DE MILHO EM ESPIGAS NA INCIDÊNCIA DE FUNGOS E NA CONTAMINAÇÃO POR MICOTOXINAS

7.1. INTRODUÇÃO

No âmbito internacional, os Estados Unidos são o maior produtor mundial de milho, com 250 milhões de toneladas, que representam 42% do total mundial. A China é o segundo, com 124 milhões, seguida pelo Brasil, terceiro produtor. A produção de México, França e Argentina, representa 30% da produção mundial (Programa..., 1999; Brandalitze, 2000).

O Brasil alcançou a produção de cerca de 33 milhões de toneladas na safra 98/99, com uma área colhida de 12 milhões de hectares e um rendimento superior a 2,7 toneladas/ha. Contudo, esse volume de grãos não supre a demanda interna, que requer mais de 36 milhões de toneladas (Programa..., 1999).

O estado Rio Grande do Sul, na safra 98/99, produziu 3,3 milhões de toneladas numa área de 1,35 milhões de hectares, com rendimento de 2,45 toneladas/hectare (Programa..., 1999).

De acordo com Programa...(1999) na colheita do milho para armazenamento em espigas em paióis tipo Chapecó, a umidade dos grãos

deve estar entre 18 e 25%. Essa modalidade de armazém possibilita a secagem natural do produto estocado em nível de propriedade. Não havendo essa condição, a colheita deve ser realizada quando a umidade dos grãos estiver abaixo de 18%.

Para Moreno & Zamora (1986), um armazém de grãos é um sistema ecológico artificial no qual organismos vivos e o meio ambiente que os cerca se interagem. A conservação do milho armazenado deve-se ao resultado das interações de fatores físicos, químicos e biológicos.

Doenças fúngicas, resultantes de uma interação, ao longo do tempo, entre um hospedeiro suscetível, um patógeno, o ambiente e um agente transmissor, são caracterizadas pela produção de sinais ou de sintomas (Agarwal & Sinclair, 1997).

Para Reis & Casa (1996) e Trento (2000), os principais agentes causais das doenças de espigas na região Sul do Brasil são as espécies de *Diplodia maydis*, *F. moniliforme*, *F. graminearum*, e fungos dos gêneros *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp..

As micotoxinas de importância na agricultura são as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, M₁ e M₂, a ocratoxina A, a zearalenona, o deoxinivalenol (DON), a toxina T2 e as fumonisinas, que ocorrem mundialmente. As aflatoxinas são produzidas por algumas espécies do grupo de *Aspergillus flavus* Link ex. Fries e pela espécie *A. parasiticus* Speare. A aflatoxina B₁ é considerada o mais potente carcinógeno natural para o homem e animais (Heathcote, 1984; Cruz, 1995; Gourama & Bullerman, 1995; Miller, 1995).

A biossíntese de aflatoxinas ocorre em ambientes com temperaturas entre 8 °C e 42 °C e substrato com umidade elevada, grãos danificados por insetos e por injúria mecânica no decorrer dos processamentos e competição entre microrganismos (Jones et al., 1981; Payne, 1983; Gourama & Bullerman, 1995; Miller, 1995).

A esterigmatocistina, micotoxina relacionada quimicamente com a aflatoxina B₁, possui toxicidade e ação cancerígena e é produzida normalmente durante o período de armazenamento pelas espécies de *Aspergillus* spp. (Vesender & Horn, 1985).

A ocratoxina A é freqüentemente encontrada em grãos no pós-colheita, sendo produzida pelos fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. A micotoxina possui potencial carcinogênico para humanos e animais (Marquardt & Frohlich, 1992; Kuiper-Goodman, 1996).

A biossíntese da ocratoxina A pode ocorrer em ambientes com temperatura entre 4 e 37 °C e umidade elevada no substrato (Marquardt & Frohlich, 1992).

As micotoxinas dos fungos do gênero *Fusarium*, como zearalenona, desoxinivalenol, nivalenol, fumonisinas e toxina T₂, são produzidas com maior freqüência no campo, antes da colheita e em condições de alta umidade dos grãos (Miller, 1995).

Para Stob et al. (1962) e Joffe (1986), a zearalenona e seus derivados naturais são produzidos por várias espécies do gênero *Fusarium*, entre as quais se destacam *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. sambucinum*, *F. solani*, *F. sporotrichoides* e *F.*

lateritium. À zearalenona atribui-se ocorrência da síndrome estrogênica em animais e humanos.

A biossíntese da zearalenona pode ocorrer em ambientes com temperaturas entre 7 e 26 °C e elevada umidade dos grãos de milho no campo, produzida por *F. graminearum* (Sherwood & Peberdy, 1974; Jiménez et al., 1996).

Dhingra & Coelho Neto (1998) consideram que o perigo de intoxicações pelo consumo de micotoxinas se tornará maior com o aumento da demanda de alimentos. Doll & Peto (1981) estimaram que aproximadamente 35% do total de mortalidade por câncer nos Estados Unidos foram relacionados a micotoxicoses manifestadas em vários tipos de câncer.

Em virtude da necessidade de se obter informações a respeito da incidência de grãos ardidos (GA) e de fungos toxigênicos e da contaminação por micotoxinas no milho pelo atraso da colheita e durante o armazenamento em espigas, este trabalho foi conduzido com o objetivo de quantificar a incidência de grãos ardidos e de fungos patogênicos e a presença de micotoxinas relacionadas com a variação do grau de umidade dos grãos no decorrer das avaliações por causa do retardamento da colheita e durante doze meses de armazenamento. A hipótese inicial era de que a incidência de fungos patogênicos e a contaminação por micotoxinas em grão de milho em espigas podem estar relacionadas com o retardamento da colheita, ao grau de umidade dos grãos e ao período de armazenamento.

7.2. MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Local e época

Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, no Laboratório de Análises de Micotoxinas do Centro de Pesquisa em Alimentação da UPF e no Laboratório de Microbiologia Fitopatológica do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da UFRGS, no período compreendido entre outubro de 1998 e julho de 2000.

7.2.2. Experimento de campo

O experimento de campo com o milho híbrido XL 212, na safra 98/99, foi desenvolvido em uma área de um hectare de lavoura, com 5,8 sementes por metro e espaçamento de 0,90 m entrelinhas, conduzido sob sistema plantio direto e com rotação de culturas.

Os experimentos de campo e de armazenamento simulado de espigas foram executados na Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo-RS.

7.2.3 Amostragem de grãos

As coletas foram realizadas com diferentes teores de umidade nos grãos, iniciando-se com umidade de 20,5%, e estenderam-se por cerca de trinta dias. Foram realizadas cinco coletas em intervalos de sete dias, tendo a última ocorrido cerca de trinta dias após o momento recomendado como o melhor para a colheita mecânica, que é quando os grãos apresentam umidade entre 18 e 26%.

As amostras foram obtidas através da coleta de grãos pelo método desenvolvido por Reis et al. (1998), o qual consistiu na escolha aleatória simples de cinco pontos distribuídos eqüidistantes dentro da área do experimento da lavoura. Foram coletadas todas as espigas de milho numa extensão de 10 m de uma fila com 5,8 plantas por metro.

Uma subamostra de dez a doze espigas foi processada, utilizando-se os grãos obtidos para determinar a umidade, a incidência dos fungos e a análise de micotoxinas.

Após o processamento da subamostra laboratorial de cada coleta, as amostras foram submetidas ao armazenamento.

7.2.4. Armazenamento simulado

As espigas foram acondicionadas nas bombonas, com capacidade para 64 kg, e o volume da amostra correspondia a cerca de 28 kg de grãos. A bombona contendo as espigas foi vedada com a tampa. Cada bombona constituiu uma unidade experimental do armazenamento simulado de espigas, tendo os grãos diferentes teores de umidade, conforme o valor determinado no momento da coleta.

Foram armazenadas cinco amostras, constituindo os tratamentos do experimento de armazenamento simulado, a partir da primeira amostra coletada com grau de umidade de 20,5% nos grãos, assim constituídos:

1ª coleta - espigas armazenadas com 20,5% de umidade;

2ª coleta - espigas armazenadas com 19,5% de umidade;

3ª coleta - espigas armazenadas com 17,8% de umidade;

4ª coleta - espigas armazenadas com 17,6% de umidade;

5ª coleta - espigas armazenadas com 17,7% de umidade.

Em intervalos de três meses, durante 12 meses foi avaliado a umidade, a incidência de fungos patogênicos e a contaminação de micotoxinas nas amostras de grãos coletados do armazenamento simulado.

7.2.5 Amostragem dos grãos armazenados

O sistema amostral recomendado no Brasil e utilizado pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento, proposto por Fonseca (1991), prevê amostragens para milho armazenado a granel ou ensacado, porém não estabelece critérios para milho armazenado em espigas.

Neste trabalho, foi adotado um programa amostral compatível com a realidade da unidade do experimento, cujo volume de grãos por tratamento foi de cerca de 28 kg.

As espigas de milho do tratamento, inicialmente, foram revolvidas e homogeneizadas; após, procedeu-se à retirada aleatória de 12 a 15 espigas, as quais foram despalhadas manualmente e debulhadas com trilhadeira. Os grãos constituíram uma amostra de, aproximadamente, 1,5 kg. A amostra foi dividida em duas subamostras, as quais foram processadas individualmente para a determinação da incidência de fungos toxigênicos e análise de micotoxinas.

7.2.6 Determinação da umidade dos grãos

A umidade dos grãos foi determinada com medidor de portátil marca Multi-Grain, modelo 46233-12, série 1233-10542, manufaturado por Dickey - Jhon Corporation - Auburn, Yllinois - EUA.

7.2.7 Incidência de grãos ardidos

A incidência de grãos ardidos (GA) foi determinada separando-se os grãos que apresentavam sintomas visuais de descoloração em mais de um quarto da sua superfície, causada pela infecção por fungos, conforme critérios estabelecidos na portaria n.º 11, de 12 de abril de 1996 (Brasil, 1996). Utilizaram-se quatro repetições de 250 gramas de grãos da amostra de cada tratamento. Os resultados foram transformados em percentagem em relação à média do total da amostra.

7.2.8 Incidência de fungos patogênicos

Das amostras de grãos coletadas foi extraída uma subamostra laboratorial, que foi desinfestada. Inicialmente, foi imersa em etanol a 70% por um minuto; em seguida, em solução de hipoclorito de sódio a 2%, por um tempo de dois minutos, e, por fim, foi enxaguada duas vezes com água destilada e esterilizada. Os grãos foram dispostos em placa de petri contendo meio de cultura um quarto de BSA (50 g de batata, cinco g de sacarose, 20 g de ágar + 500 ppm de sulfato de estreptomicina) por litro de meio de cultura. Cada placa de petri continha cerca de 20 g de meio de meio de cultura. As placas com os grãos de milho foram incubadas em câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de doze horas por um período de cinco a sete dias.

As incidências de fungos associados aos grãos foram obtidas a partir de uma amostra composta de quatro subamostras (repetições) de cem grãos (Brasil, 1992). Os grãos foram plaqueados num arranjo experimental de quatro repetições de vinte placas com cinco grãos cada e incubados em câmara de crescimento. Após o crescimento, com auxílio de lupa estereoscópica e microscópio ótico, procedeu-se à identificação dos fungos.

Os resultados foram expressos em incidência média de fungos, resultante da média aritmética das quatro repetições. As médias de incidência obtidas em números absolutos foram convertidas em valores relativos.

7.2.9 Análise de micotoxinas

O método utilizado para determinação das micotoxinas foi a cromatografia em camada delgada. A preparação de solução de estoque dos padrões e a determinação exata da concentração seguiram a metodologia descrita no item 971.22 Scott (apud AOAC, 1997). Os processos de extração, clarificação e concentração do estrato seguiram a metodologia desenvolvida por Soares (1987) para determinação simultânea das micotoxinas aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, ocratoxina A, zearalenona e esterigmatocistina descrita, nos itens 982.24, 982.25 e 982.26 da AOAC (1997).

Realizou-se a triagem das micotoxinas em todas as amostras; após, as que apresentaram resultados positivos foram submetidas à

confirmação por cromatografia em camada delgada bidirecional. A quantificação foi realizada por comparação visual da intensidade de fluorescência da mancha-amostra com a fluorescência da mancha das alíquotas dos padrões aplicados (Patterson & Roberts, 1979).

Foi utilizada a metodologia de Scott (apud AOAC, 1997) para confirmar as aflatoxinas B₁ e G₁; para a confirmação de ocratoxina A e zearalenona, foi aplicada a metodologia de Golinski & Grabarkiewicz-Szczena (apud AOAC, 1997). A confirmação da esterigmatocistina seguiu a metodologia oficial constante no item 973.38 da AOAC (1997).

Os limites de detecção do método para a quantificação das amostras foram: aflatoxinas - B₁: 3 (µg/kg); B₂: 2 (µg/kg); G₁: 3 (µg/kg) e G₂: 2 (µg/kg), zearalenona: 527,04 (µg/kg), ocratoxina A: 76,48 (µg/kg), esterigmatocistina: 84,8 (µg/kg).

Extratos de grãos de milho para as análises das micotoxinas pelo método de cromatografia de camada delgada (CCD), utilizou-se cromatofolhas de alumínio com camada de silicagel 60, 20 x 20.

Foram empregados padrões de aflatoxinas B₁ (A 6636), B₂ (A9026), G₁ (A0138), G₂ (A9151); ocratoxina A (O1877); esterigmatocistina (S3255) e zearalenona (Z2126).

A concentração das soluções padrões de trabalho foi de aflatoxinas [B₁ (0,5(g/g)); [B₂ 0,1(g/g)]; [G₁ (0,5(g/g))] e [G₂ 0,1(g/g)], ocratoxina A [4,79(g/g)], zearalenona [54,9(g/g)] e esterigmatocistina [5,3(g/g)].

Os reagentes utilizados foram p.a..

7.2.10 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento completamente casualizado (DCC) constou de cinco tratamentos e quatro repetições constituído por espigas que correspondiam a cerca de 28 kg de grãos contidas em bombona de plástico para armazenamento simulado, caracterizadas por unidades experimentais para cada avaliação e determinação realizadas.

Os resultados foram submetidos à técnica de análise de variância univariada a 5% de probabilidade pelo teste F de significância e análise de regressão polinomial.

Utilizou-se o programa computacional Sistema de Análise de Variância, versão 3.02 - SISVAR.

7.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.3.1 Incidência de fungos patogênicos e de grãos ardidos

Os resultados das avaliações revelaram que a incidência de grãos ardidos (GA), de acordo com a Figura 1, não evoluiu em razão da permanência do milho na lavoura, mas, provavelmente, por causa da umidade elevada dos grãos apresentada durante o período de avaliações, a qual se manteve acima de 17,7%. Os GA, além dos sintomas característicos que comprometem o rendimento, a qualidade comercial e nutritiva da produção, podem ser contaminados por micotoxinas, que causam danos à saúde humana e animal, conforme Lazzari (1997).

O reduzido incremento da incidência dos GA pode estar relacionado com a perda da umidade pelos grãos, que inibiu a atividade

metabólica dos fungos dos gêneros *Fusarium* e *Diplodia*, os quais são os principais agentes causais das doenças de podridões de espigas. Esses patógenos, provavelmente, colonizam grãos que se encontram entre o estágio leitoso e o farináceo, e os sintomas das podridões manifestam-se a partir do estágio dos grãos fisiologicamente maduros.

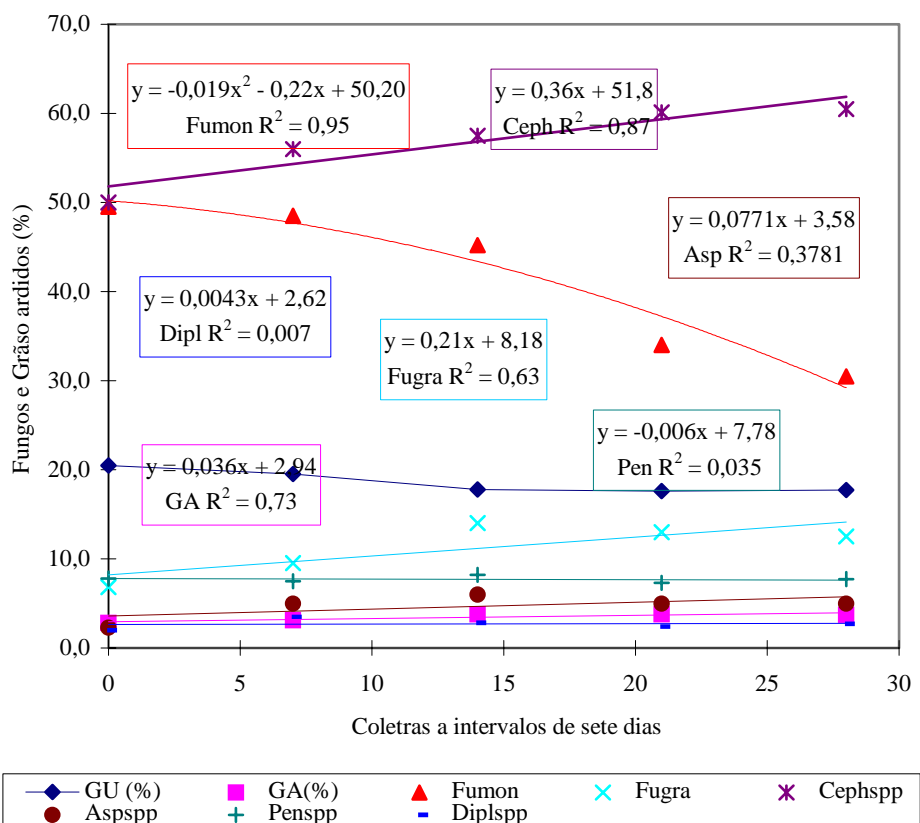


FIGURA 1- Relação entre o teor de umidade dos grãos de espigas de milho coletadas a intervalos de sete dias durante trinta dias e a incidência de grãos ardidos (GA) de fungos na safra 98/99.

O fungo *Fusarium moniliforme* apresentou redução de incidência à medida que o milho permaneceu na lavoura. Essa resposta pode estar relacionada à baixa umidade dos grãos e ao crescimento de outros fungos, como *Cephalosporium* spp., *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp.. A espécie *Fusarium graminearum* revelou uma pequena elevação na incidência nos quinze dias iniciais de avaliações,

estabilizou-se após; assim, o incremento do fungo *F. graminearum* pode estar mais relacionado com a redução da umidade do que com a permanência do milho na lavoura.

A permanência do milho na lavoura influenciou na incidência das espécies de *Cephalosporium* spp., que apresentaram elevação acentuada até o final das avaliações. A ausência de relatos em literatura não possibilitou relacionar os resultados obtidos, pois Shurtleff (1992) cita o fungo *Cephalosporium maydis* como habitante natural do solo, embora sugira a possibilidade de que passa infectar as plantas de milho através dos estigmas; já Koheler (1942) o classifica como necrotrófico e Ueno (1983) destaca a produção de micotoxinas do grupo tricotecenos por espécies de *Cephalosporium* spp..

A incidência das espécies de *Aspergillus* spp e de *Penicillium* spp. não revelou relação entre a permanência dos grãos na lavoura e a umidade desses durante as avaliações. Essas espécies de fungos apresentam, normalmente, preferência pelos substratos com reduzida atividade fisiológica.

As espécies do gênero *Diplodia* são vulneráveis à prática de rotação de culturas; provavelmente, por esse motivo, apresentaram baixa incidência e não sofreram alteração no decorrer das avaliações.

7.3.2. Incidência de fungos patogênicos nos grãos armazenados em espigas

Os resultados (Figura 2) demonstraram que o tempo de armazenagem, associado com a umidade dos grãos, favoreceu o desenvolvimento das espécies de fungos *Aspergillus* spp. e *Penicillium*

spp., que alcançaram a incidência, respectivamente, de 20% e 25% ao final dos doze meses de armazenamento, quando o teor de umidade dos grãos atingiu o percentual de 25,5% (Tabela 1). Esses resultados demonstram que a umidade é o fator de maior influência na conservação dos grãos visto que, segundo Eichelberger (2000), a redução da umidade dos grãos faz com estes reduzam a sua respiração a níveis muito baixos, diminuindo o consumo das reservas e a produção de calor, o que contribui para a manutenção das características nutritivas.

O inóculo das espécies de *F. moniliforme* e *F. graminearum* foi perdendo a viabilidade em decorrência do tempo de armazenamento e, possivelmente, em função da umidade, que se elevou à medida que transcorria o período de armazenamento. Esses fatos podem ter criado uma situação de competição entre as espécies que se desenvolveram durante o período de armazenagem.

Os fungos das espécies de *Cephalosporium* spp iniciaram a perda de viabilidade a partir da elevação da incidência das espécies *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp., consideradas espécies de armazenamento. Essa resposta indica a possível competição entre essas espécies.

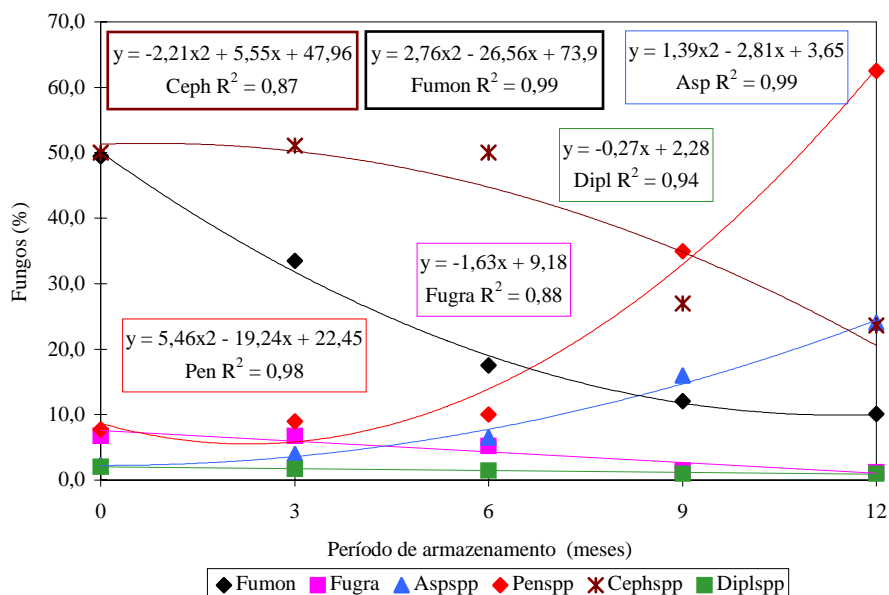


FIGURA 2- Relação entre período de armazenamento de grãos milho em espigas com umidade inicial de 20,5% e a incidência de fungos patogênicos e produtores de micotoxinas, avaliada a intervalo de três meses. Safra 98/99.

Essa atividade fúngica ficou caracterizada também na Figura 3 com a elevação do grau de umidade dos grãos, de 19,5% e para 21,8%, e pelo incremento da incidência dos fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, que passou, respectivamente, de 5,0% e 7,75% para 20,0% e 25,5% ao final de um ano de armazenamento.

Houve redução da incidência dos fungos *F. moniliforme* e *F. graminearum*, indicando perda da viabilidade do inóculo em virtude do período de armazenamento, do grau de umidade e da inadequação das estruturas de resistência do fungo para a sobrevivência em ambiente de armazenamento.

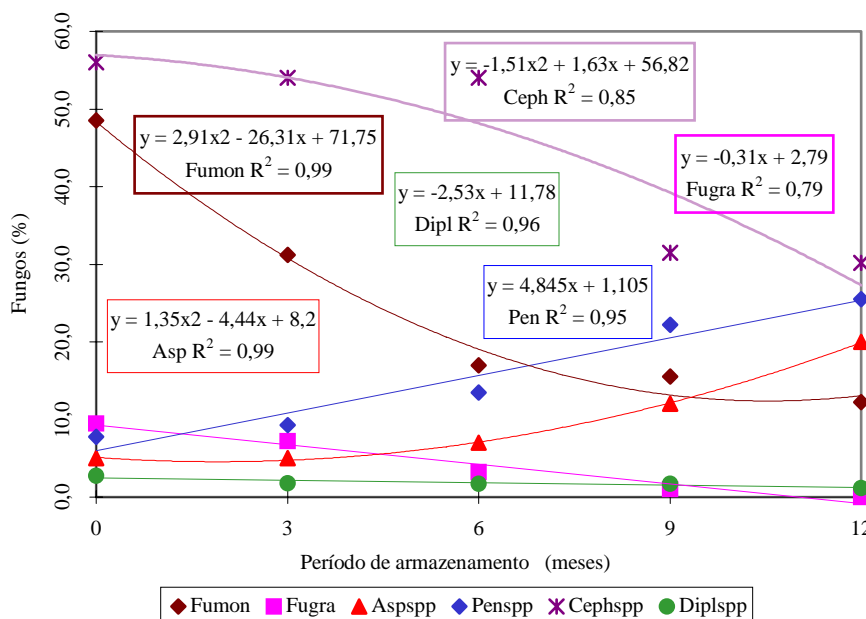


FIGURA 3- Relação entre tempo de armazenamento de grãos de milho em espigas com umidade inicial de 19,5% e a incidência de fungos patogênicos e produtores de micotoxinas, avaliada a intervalo de três meses. Safra 98/99.

A redução mais acentuada da incidência dos fungos das espécies *Cephalosporium* spp. (Figura 3) iniciou a partir do período em que as espécies de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. manifestaram maior atividade metabólica, indicada pelo aumento da incidência. Essa resposta pode estar relacionada à competição entre as espécies desses gêneros, à redução de oxigênio e aumento da concentração de CO₂.

Os resultados de avaliações de grãos em espigas (Figura 4) armazenados com umidade inicial de 17,8% revelaram que houve atividade microbiológica e fisiológica dos grãos, caracterizada pela elevação da umidade, que passou de 17,8% para 19,0% ao final do período de armazenamento. Essa variação da umidade foi decorrente do metabolismo, com elevação na incidência das espécies de *Aspergillus* spp. (18,0%) e *Penicillium* spp. (23,5%), ao final dos doze meses.

As espécies *F. moniliforme* e *F. graminearum* apresentaram

redução de incidência com o passar do tempo de armazenamento e alcançaram, respectivamente, 16,0% e zero por cento ao final de doze meses de armazenamento.

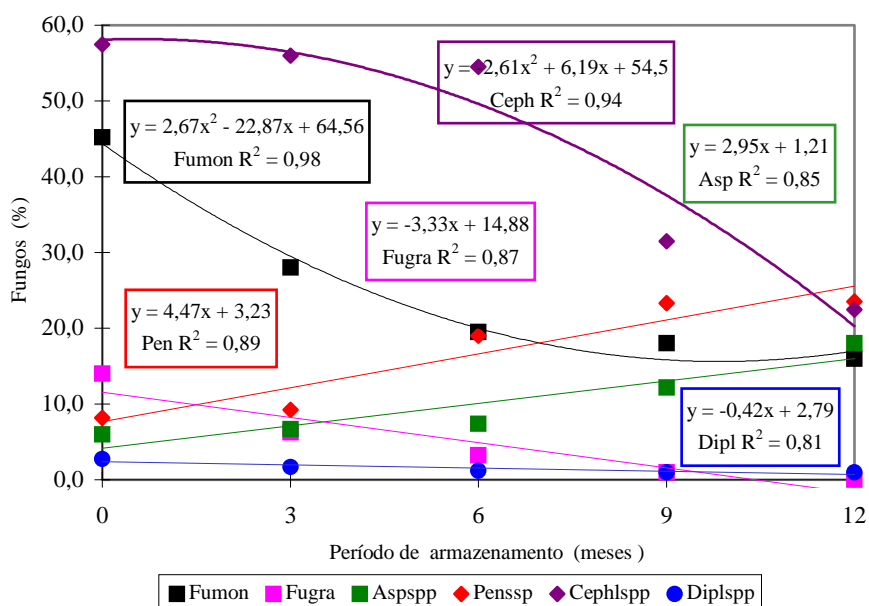


FIGURA 4- Relação entre tempo de armazenamento de grãos de milho em espigas com umidade inicial de 17,8% e a incidência de fungos patogênicos e produtores de micotoxinas, avaliada a intervalo de três meses. Safra 98/99.

Com o incremento da incidência dos fungos *Aspergillus* e *Penicillium* (Figura 4), houve redução da presença de *Cephalosporium* spp. Deduz-se, com isso, que a elevada presença dos fungos *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., o aumento de CO₂ e a redução de oxigênio pode ter interferido na sobrevivência dos propágulos desse fungo.

Na Figura 5, estão as incidências de fungos toxigênicos em grãos de espigas coletadas cerca de 28 dias após a primeira coleta e armazenadas com 17,6% umidade. Houve atividade metabólica, identificada pela elevação da umidade dos grãos, que passou de 17,6

para 18,3%. As espécies de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. tiveram elevação de incidência, que passou, respectivamente, de 5,0% e 7,3% para 16,5% e 19,5%. Segundo Lazzari (1997), a umidade do grão de milho acima de 16% oferece condições para um rápido crescimento fúngico.

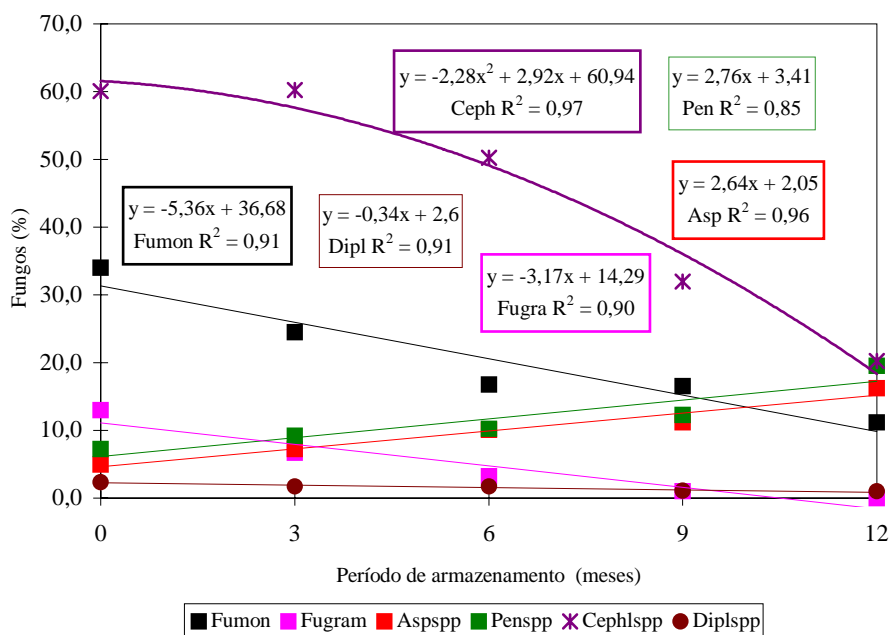


FIGURA 5- Relação entre tempo de armazenamento de grãos de milho em espigas com umidade inicial de 17,6% e a incidência de fungos patogênicos e produtores de micotoxinas, avaliados a intervalo de três meses. Safra 98/99.

As espécies *F. moniliforme*, *F. graminearum* e *Cephalosporium* spp. apresentaram redução da viabilidade ao longo do armazenamento, sugerindo que os grãos armazenados não constituíram ambiente favorável para na sua sobrevivência que podem ser decorrentes da elevação de CO₂ e da redução da concentração de oxigênio.

A umidade de 17,7% dos grãos armazenados em espigas (Figura 6) favoreceu o crescimento dos fungos considerados de armazém, representados pelas espécies de *Aspergillus* spp. e *Penicillium*

spp. após doze meses de armazenamento, apresentaram, respectivamente, 14,5% e 20,5% de incidência.

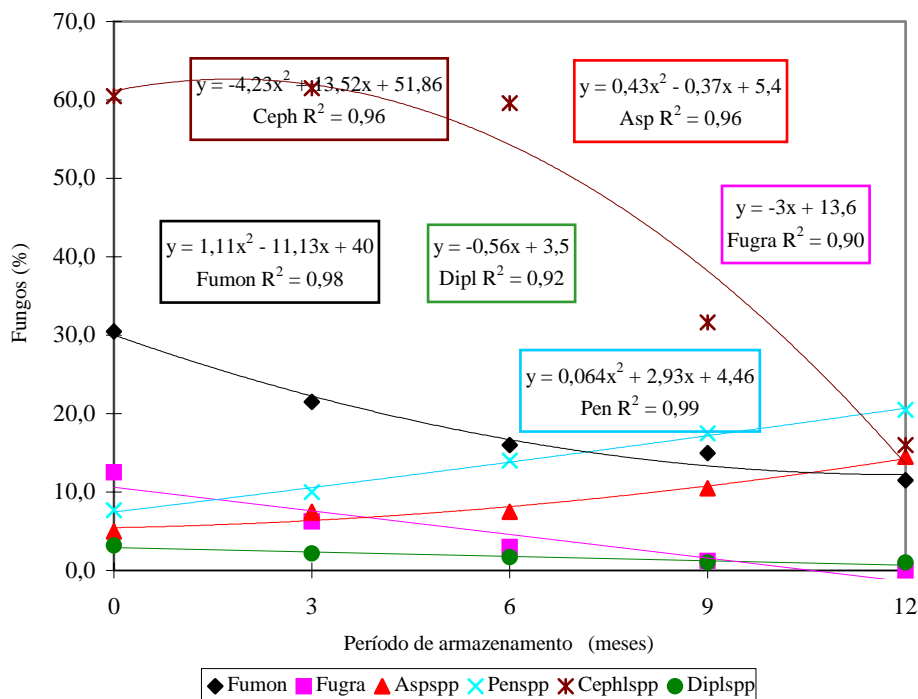


FIGURA 6- Relação entre tempo de armazenamento de grãos de milho em espigas com umidade inicial de 17,7% e a incidência de fungos patogênicos e produtores de micotoxinas, avaliados a intervalo de três meses. Safra 98/99.

Nessa condição de armazenamento, as espécies *Cephalosporium* spp. demonstraram perda de viabilidade do inóculo a partir de seis meses de armazenamento que pode ser em consequência das atividades fisiológicas dos fungos de armazenamento.

7.3.3 Contaminação por micotoxinas

A Tabela 1 apresenta os resultados das análises de micotoxinas realizadas nas amostras provenientes das coletas da lavoura. Essas condições podem ter sido o fator que levou à produção da

micotoxina zearalenona (878,4ppb), detectada na amostra da última coleta.

A micotoxina detectada na última coleta pode estar relacionada com o clima da estação do outono, período em que podem ocorrer variações acentuadas de temperatura entre o dia e a noite, e, à competição entre as espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Para Eugênio et al. (1970), a zearalenona pode ser sintetizada em milho em ambiente com temperaturas constantes ou alternadas e com alta umidade.

Não foram detectadas micotoxinas nas análises realizadas nos dois primeiros períodos de armazenamento. Todavia, a partir da terceira avaliação, com nove meses de armazenamento, foram detectadas as micotoxinas zearalenona, esterigmatocistina e ocratoxina A. Esses resultados podem ter ocorrido em razão do período de armazenamento e da umidade, que se elevou por causa da elevação da incidência dos fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (Figura 2).

A avaliação realizada aos doze meses de armazenamento revelou a presença de micotoxinas em todas as amostras de espigas coletadas. Foram detectadas as micotoxinas ocratoxina A e esterigmatocistina em quantidades elevadas; em duas amostras foram detectadas as duas micotoxinas, ocratoxina A e esterigmatocistina. Esses resultados demonstram que a umidade e o tempo de armazenamento foram os fatores responsáveis pela contaminação e pelos danos à qualidade nutricional e comercial do milho armazenado. Dessa forma, pode-se concordar com Soares (1987) e Marquardt & Frohlich (1992), os

quais relatam a produção da esterigmatocistina e ocratoxina A por espécies dos gêneros *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp..

TABELA 1. Resultados das análises de micotoxinas obtidos para as combinações retardamento da colheita e umidade de coleta com o período de armazenamento dos grãos de milho em espigas a intervalos de três de meses.

Período de armazenamento	Retardamento da colheita (dias) e grau de umidade (%) dos grãos				
	Micotoxinas detectadas (ppb)				
0 meses	0 dias- 20,5	7 dias-19,5	14 dias-17,8	21 dias-17,6	28 dias-17,7
	-	-	-	-	ZEA - 878,4
3 meses	20,2	18,8	17,5	17,5	17,5
	-	-	-	-	-
6 meses	21,5	19,8	17,9	18,0	17,9
	-	-	-	-	-
9 meses	22,5	19,8	18,7	18,3	18,2
	ZEA - 229,7	-	EST - 84,9	-	-
12 meses	25,5	21,8	19,0	18,3	18,2
	OCR - 107,3	EST - 50,9	EST - 45,9	OCR - 76,4	OCR - 75,6
	EST - 339,2		OCR - 84,8		

EST - Esterigmatocistina; OCR - Ocratoxina A; ZEA - Zearalenona

7.4. CONCLUSÕES

A contaminação do milho na lavoura por micotoxinas de *Fusarium* foi ocorreu em decorrência do retardamento da colheita.

O incremento da incidência de fungos patogênicos de armazenamento e a contaminação por micotoxinas em grãos de milho armazenados em espigas estão relacionados ao grau de umidade dos grãos e ao período de armazenamento.

O armazenamento do milho em espigas com umidade superior a 17,6% foi inconveniente para a sua conservação.

CAPÍTULO VIII

EFEITO DO ARMAZENAMENTO NA CONSERVAÇÃO DA QUALIDADE NUTRITIVA DOS GRÃOS DE MILHO EM SILOS VERTICAIS

8.1. INTRODUÇÃO

O armazenamento de grãos de milho em silos tem o objetivo de manter a quantidade e as propriedades nutritivas do produto até o seu consumo ou industrialização (Eichelberger, 2000). Todavia, a conservação dos grãos requer conhecimento do armazenista sobre as condições adequadas de armazenamento (Lazzari, 1997).

Os fatores que afetam a qualidade do armazenamento de grãos de milho são: teor de umidade dos grãos, umidade relativa do ar, temperatura, danos mecânicos, fungos, insetos, impurezas, taxa de oxigenação, pH e período de armazenamento (Wetzel, 1987; Puzzi, 1989; Eichelberger, 2000).

O monitoramento e o controle das condições ambientais são mais exeqüíveis no armazém do que no campo. O manejo dos fatores físicos e biológicos do armazenamento é a melhor maneira de se evitar o desenvolvimento de fungos de pós-colheita. O ambiente em que os fungos e o milho interagem é crítico para se saber se ocorre ou não a

contaminação por micotoxinas (Mantovani & Fontes, 1989; Fonseca, 1999).

Mantovani & Fontes (1989) e Dowswell et al. (1996) destacam que os grãos de milho têm boa capacidade de armazenamento e que o tempo de sua conservação aumenta quando se reduzem a umidade e a temperatura da massa de grãos. Por causa das propriedades higroscópicas do grão, a umidade é o fator principal.

Kososki (1977), Christensen & Meronuck (1986) e Lazzari (1997) destacam que, para se obter uma armazenagem segura, a umidade dos grãos deve ser suficientemente baixa de modo que a umidade relativa do ar intergranular fique abaixo de 70,0%. Para uma armazenagem a longo prazo é recomendável a umidade intergranular de 65,0% e dos grãos, abaixo de 14,0%.

A legislação brasileira, através da resolução nº 103 de 1975, do Concex, estabelece um máximo de 14,5% de umidade no milho para que seja armazenado e comercializado. Fonseca (1999) observa que, nesse percentual de umidade, dificilmente o *A. flavus* se desenvolve e produz aflatoxinas.

Quando a colheita é antecipada a secagem artificial é imprescindível para a conservação dos grãos e objetiva a separação parcial da água da parte sólida do produto até o limite conveniente, minimizando as perdas das propriedades físicas, químicas e biológicas dos grãos. Os melhores resultados da operação são obtidos com temperaturas próximas de 90 °C do ar (Gunasekaran et al., 1985; Brooker et al., 1992; Weber, 1998).

A aeração é definida como um sistema de ventilação mecânico cuja principal finalidade é resfriar e manter a massa de grãos a uma temperatura uniforme e baixa e auxiliar na secagem, assegurando a boa conservação do produto armazenado (Montovani & Fontes, 1989; Weber, 1998; Eichelberger 2000).

Os danos por injúria, de origem mecânica ou por qualquer outro agente nocivo geram os grãos partidos, trincados e as lesões visíveis no tegumento, ocorrendo durante todo o ciclo produtivo. Os grãos nessas condições incrementam a taxa de respiração, gerando umidade e calor e, ao mesmo tempo, consomem a matéria seca do grão, criando ambiente favorável para o crescimento dos fungos de armazenamento (Mantovani & Fontes 1989; Puzzi, 1989; Weber, 1998).

Os esporos dos fungos de campo podem sobreviver durante muito tempo em grãos úmidos, contudo, morrem quando os grãos são armazenados com teor de umidade em equilíbrio com umidades relativas inferiores a 75,0% (Lutey & Christensen, 1963).

Para Christensen & Kaufmann (1986), a disseminação dos fungos ocorre a partir de várias fontes de inóculo, como os próprios grãos, impurezas, insetos e poeira residual nos silos. Foram encontrados mais de três milhões de esporos por grama de pó coletado em silos, dos quais predominaram *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp..

Os fungos são importantes causas de deterioração de grãos de milho estocados em silos. Provocam a descoloração dos grãos, a redução da germinação, a formação de micotoxinas e o decréscimo de matéria seca (Moreno-Martinez, & Christensen, 1971; Moreno & Zamora, 1986).

São conhecidas mais de quinhentas espécies de micotoxinas, todas capazes de provocar algum tipo de patologia em humanos e em animais. Entre elas, as mais estudadas e importantes para a micotoxicologia são as aflatoxinas, a esterigmatocistina, as fumonisinas, as ocratoxinas, os tricotecenos e a zearalenona (Gourama & Bullerman, 1995; Miller, 1995).

As aflatoxinas congregam o grupo mais importante das micotoxinas, sendo produzidas pelos fungos do gênero *Aspergillus* (Gourama & Bullerman, 1995).

As ocratoxinas são produzidas pelas espécies *Aspergillus alutaceus* (= *A. ochraceus*) e *Penicillium verrucosum* e *P. veridicatum* em cereais, entre os quais o milho, e, se ingeridas, causam micotoxicoses tanto para humanos como para animais (Marquart & Frohlic, 1992).

A zearalenona é um metabólito do gênero *Fusarium*, cujas principais espécies produtoras são *F. graminearum* e *F. moniliforme*. A toxina pode ser encontrada no milho antes da colheita e também durante o armazenamento, quando as condições são favoráveis; é cancerígena e identificada com o estrogenismo em animais e humanos (Nijs et al., 1996; Fonseca, 1999).

As fumonisinas constituem um grupo de micotoxinas que contaminam grãos de milho e são identificadas com surtos de doenças e morte de animais. São produzidas por fungos de gênero *Fusarium*, sendo citadas com maior frequência as espécies de *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. nygamai*, *F. anthophilium* e *F. napiforme* (Thiel et al., 1991; Nelson et al., 1992).

Os tricotecenos são compostos tóxicos para o homem e os animais, e os fungos do gênero *Fusarium* produzem várias espécies dessas toxinas em grãos de milho. São também produzidos por fungos dos gêneros *Cephalosporium*, *Trichoderma*, *Trichotecium* e *Myrothecium*. Os tricotecenos mais importantes são nivalenol, deoxinivalenol e toxina T2. Essas substâncias são associadas a sintomas tóxicos, como vômitos, diarreia, anorexia alterações hematológicas destruição da medula óssea e hemorragia generalizada, seguidos ou não de morte tanto em humanos como em animais (Ueno, 1986; Dhingra & Coelho Neto, 1998; Whitlow & Hagler Jr, 1999).

A qualidade do milho é determinada pela composição bromatológica com base na massa de matéria seca e envolve os parâmetros proteína bruta, fibra bruta, fibra em detergente ácido, fibra em detergente neutro, resíduo mineral e nutrientes digestíveis totais (Dourado Neto & Fancelli, 2000).

A espectroscopia de reflectância no infravermelho proximal (NIRS = ERIP) é utilizada por várias áreas da ciência. Sua expansão é atribuída ao desenvolvimento dos computadores, tanto nos programas constituídos para esta área específica como nos programas de estatística, o que possibilita o seu uso em grande escala na área da química analítica e bromatológica (Moore et al., 1994).

A radiação no infravermelho, quando absorvida pelas ligações entre os átomos de determinada molécula, provoca movimentos de distensão, de rotação e de vibração, que são específicos para cada tipo de ligação covalente presente. Os espectros resultantes dessa absorção podem ser utilizados para identificar compostos puros ou compostos

complexos, pois as curvas espectrais do composto no infravermelho proximal são caracterizados e podem ser comparadas a uma “impressão digital” do composto (Vogel, 1992).

A técnica de espectrometria de reflectância baseia-se na utilização de curvas espectrais dos substratos analisados. Esses espectros são obtidos por meio da radiação da amostra no infravermelho proximal, entre 1100 e 2500 nm, sendo, portanto, o resultado da absorção de energia na forma de luz por moléculas orgânicas, particularmente as que possuem grande número de ligações do tipo CH, NH e OH. A energia absorvida por par de átomos é específica, assim como para o tipo e o número de átomos em questão. (Shenk & Westerhaus, 1991).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do período de armazenamento na conservação da qualidade nutritiva dos grãos em função da variação da incidência de fungos patogênicos e de GA, pela quantificação da variação percentual de IMV e de GN e das características químicas nutricionais e pela presença de micotoxinas.

Os objetivos foram formulados mediante a hipótese de que o tempo de armazenamento influencia na incidência de fungos patogênicos e na conservação da qualidade nutritiva do milho armazenado.

8.2 MATERIAL E MÉTODOS

8.2.1 Local e época

As avaliações e determinações foram realizadas no laboratório de Fitopatologia do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, no Laboratório de Micotoxinas do Centro de Pesquisa em

Alimentação da UPF e no Laboratório de Microbiologia Fitopatológica do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da UFRGS, no período compreendido entre outubro de 1999 e janeiro de 2001, envolvendo a safra agrícola 99/2000.

8.2.2 Experimento de campo

Os experimentos de armazenamento foram executados nos silos elevados em concreto da cooperativa Tritícola de Erechim Ltda. (Cotrel), em Erechim - RS, e nos silos metálicos da empresa Cerealista Lodi Ltda. (Lodi), em Marau - RS.

8.2.3. Enchimento dos silos: Silo 3 - Cotrel; Silo 5 - Lodi

O enchimento do silo 3 da Cotrel, cuja capacidade é de 2.000 toneladas, teve início em de 20 maio e se estendeu até 13 de junho/2000. O silo recebeu duas mil toneladas de grãos de milho, oriundos de agricultores cooperativados da região do Alto Uruguai, onde está localizada a Cotrel.

O enchimento do silo 5 da Lodi, cuja capacidade é de 2.800 toneladas, iniciou-se a partir de 20 maio e se estendeu até 30 de junho/2000. O silo recebeu cerca de 2.760 toneladas de grãos de milho, capacidade máxima de armazenagem, oriundos sobretudo de produtores das regiões do Planalto Médio e Alto Uruguai.

O transporte dos grãos até os silos da cerealista foi realizado por caminhões, os quais, chegarem foram pesados e deles retiradas amostras de grãos para classificação e determinação da umidade dos grãos. Após, o milho foi descarregado nas moegas, de onde foi

transportado para a pré-limpeza, operação em que são removidas as impurezas e os fragmentos dos grãos. Na seqüência, foi secado com calor seco à temperatura de 120 °C até atingir a umidade de média de 14,5% e, em seguida, conduzido ao silo de armazenamento onde passou a ser monitorado diariamente através do sistema de termometria.

8.2.3.1 Lotes de grãos: silo 3 - Cotrel; silo 5 - Lodi

Os lotes de grãos foram constituídos e identificados conforme a chegada dos grãos de milho aos silos. Foi estabelecido que o volume de grãos próximo de 450 t formaria um lote; dessa maneira, foram constituídos quatro lotes em cada silo pesquisado.

8.2.4. Processo de amostragem

O sistema de amostragem recomendado no Brasil e utilizado pelo Ministério da Agricultura foi idealizado por Fonseca (1991) e estabelece o seguinte critério para produtos a granel com volume superior a 500t: realizar uma amostragem aleatória retirando-se 40 kg de amostra, procedimento que deve ser conduzido através da fórmula $N = \sqrt[6]{n}$, na qual N representa o número de subamostras de 400g e n, o número de toneladas do lote. Para produtos a granel, quando apresenta tonelagem inferior a quinhentas toneladas, faz-se uma amostragem aleatória, retirando-se uma amostra de 40 kg.

Conforme critério proposto por Fonseca (1991), foram colhidas subamostras de 500g pelo sistema aleatório, com auxílio de calador, no universo de grãos do lote identificado, até ser constituída uma amostra coletiva de 40 kg de grãos. Dessa amostra foi extraída a

amostra laboratorial, com cerca de 4 kg, da qual, por partição, foram obtidas as subamostras analíticas.

8.2.5 Sistema de termometria

8.2.5.1 Silo 3 - Cotrel; silo 5 Lodi

O silo 3 é conetctado ao sistema controlador termoaerador da Fockink Indústrias Elétricas Ltda., de Panambi - RS, denominado Air Master Plus, constituído de módulo controlador, estação meteorológica, módulo de força dos motores e silo com ventilador de aeração; equipado com cabos termossensores e microcomputador na sala de controle de operações, onde se encontra o armazenista. O controlador termoaerador Fockink foi programado e operado para registrar horas e datas de aeração e a temperatura dos grãos. O acionamento dos motores de aeração, conforme programa instalado, ocorria automaticamente em intervalos de seis horas. A temperatura e umidade dos grãos foram programadas para serem registradas em intervalos de 45 minutos.

O silo 3 manteve o teor de umidade média dos grãos em entre 14,0 e 15,0% e a umidade relativa do ar intergranular em 70%. O sistema de aeração foi acionado 862 horas durante o período de estocagem dos grãos; foi acionado no início de junho e mantido em atividade até 11 de novembro de 2000. Nesta data, o silo foi esvaziado e as operações de controle, desativadas. Foram considerados cinco meses de armazenamento monitorado pelo sistema termocontrolador na execução desta pesquisa.

O silo 5 é dotado de cabos termossensores com ponto de conexão externo. A temperatura dos grãos foi monitorada diariamente,

em intervalos de 24 horas ou em intervalos menores, conforme a leitura anterior. Os motores de aeração eram acionados manualmente, de acordo com a indicação do sistema de termometria.

Os grãos de milho foram armazenados com teor de umidade na faixa de 14,0 a 15,0% e umidade relativa do ar intergranular próxima de 70%. Essa condição foi mantida por meio de sistema de aeração. Foram utilizadas 304 horas de aeração durante o período de permanência dos grãos no silo. Sempre que a temperatura dos grãos apresentasse alterações os motores de aeração eram acionados. O controle da termometria por aeração teve início no dia 25 de maio e foi mantido até 22 de dezembro de 2000.

O monitoramento do sistema de armazenamento foi realizado durante seis meses, considerando o período de emprego da aeração. O silo foi esvaziado e limpo no dia 23 de dezembro de 2000, data em que todas as operações de controle foram encerradas. Para efeito da pesquisa, foram considerados seis meses de armazenamento.

8.2.6 Determinação da umidade dos grãos

A umidade dos grãos foi determinada com medidor portátil marca Multi-Grain, modelo 46233-12, série 1233-10542, manufaturado por Dickey - Jhon Corporation - Auburn, Yllinois - EUA.

8.2.7 Determinação do Peso Hectolitro (PH) dos grãos

A determinação do PH foi realizada com o auxílio de balança hectolétrica cuja capacidade foi de um quarto de volume de litro. Foram usadas quatro subamostras de amostra laboratorial para se determinar a

média do PH em kg/hl. A balança é fabricada pela empresa de Ângelo Dalle Molle, de Caxias do Sul, no Rio Grande do Sul.

Simultaneamente, foi determinada a umidade dos grãos. De acordo com a resolução 103, de 21 de outubro de 1975 (Concex, 1975) o teor de umidade dos grãos de milho é de 14,5%. O valor do PH foi corrigido considerando-se a umidade de 14,5% como padrão.

8.2.8 Análise bromatológica dos grãos

A qualidade de conservação dos grãos no armazenamento foi investigada através das informações bromatológicas pelo método de espectrometria de reflectância no infravermelho proximal(NIRS = ERIP).

Para as análises, foi usado um espectrômetro (Perstorp Analytical, Silver Spring, MD) modelo 5.000, acoplado a um microcomputador equipado com software ISI versão 4.1 (Infrasoft Stander International - (ISI), University Park, Pensilvânia, EUA). As amostras de grãos foram secas a 60 °C sob circulação de ar; posteriormente, moídas em moinho tipo Wiley, com tamanho de crivo da peneira de 1,0 mm, e acondicionadas em frascos de vidros com capacidade para 100g. As amostras analíticas foram analisadas de acordo com a AOAC, (1997) para obter os teores de massa de matéria seca (MS) e proteína bruta (PB). As análises de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram realizadas de acordo com o método descrito por Goering & Van Soest (1970).

8.2.9 Incidência de grãos ardidos

A incidência de GA foi determinada visualmente, separando-se os grãos que apresentavam sintomas de descoloração em mais de um quarto da superfície, causada pela infecção por fungos (Brasil, 1996). Utilizaram-se quatro repetições de 250 gramas de grãos de amostra coletada. Os resultados foram transformados em percentagem em relação à média do total da amostra.

8.2.10 Incidência de fungos patogênicos

A amostra laboratorial de grãos proveniente da partição foi desinfestada; inicialmente, foi imersa em etanol a 70% por um minuto; em seguida, em solução de hipoclorito de sódio a 2%, por um tempo de dois minutos, e, por fim, foi enxaguada duas vezes com água destilada e esterilizada. Os grãos foram dispostos em placas de petri contendo meio de cultura um quarto de BSA (50 g de batata, 5 g de sacarose, 20 g de ágar e 500 ppm de sulfato de estreptomicina) por litro de meio de cultura. Conforme Brasil (1992), foram empregados quatrocentos grãos plaqueados, arranjados em quatro repetições de vinte placas com cinco grãos; após, as placas foram incubadas em câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas por um período de cinco a sete dias.

Após o crescimento, com auxílio de lupa estereoscópica e microscópio ótico, realizou-se a identificação e a quantificação das espécies. Os resultados foram expressos em incidência média de fungos, resultante da média aritmética das quatro repetições. As médias de incidência obtidas em números absolutos foram convertidas em valores relativos.

8.2.11 Determinação dos grãos com injúria mecânica visível

A injúria mecânica visível (IMV) de grãos foi determinada pelos sintomas visuais conforme critério de Bergamin Filho (1995), que define injúria como qualquer sintoma visível causado por um organismo nocivo. Foram utilizadas quatro subamostras de 250g de grãos da amostra homogênea. Nessas, foram separados todos os grãos quebrados, trincados e que apresentavam injúria no tegumento. O peso foi corrigido para 14,5% de umidade dos grãos.

Os resultados foram expressos em porcentagem, resultante da média aritmética das quatro repetições. As médias de incidência, obtidas em números absolutos, foram convertidas em valores relativos.

8.2.12 Grãos normais

Os GN representam os grãos sadios e inteiros e ausência de sinais de danos mecânicos ou injúrias por insetos. O resultado percentual foi obtido em relação à média final das quatro repetições de 250 g da amostra analítica.

8.2.13 Análise de micotoxinas

O método utilizado para a determinação das micotoxinas foi a cromatografia em camada delgada. A preparação de solução estoque dos padrões e a determinação exata da concentração seguiram a metodologia descrita no item 971.22, conforme Scott apud AOAC (1997). Os processos de extração, clarificação e concentração do estrato seguiram a

metodologia desenvolvida por Soares apud AOAC (1997) para determinação simultânea das micotoxinas: aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, ocratoxina A, zearalenona e esterigmatocistina descritos, nos itens 982.24, 982.25 e 982.26 (AOAC, 1997).

Realizou-se a triagem das micotoxinas em todas as amostras; após, as que apresentaram resultados positivos foram submetidas à confirmação por cromatografia em camada delgada bidirecional. A quantificação foi realizada por comparação visual da intensidade de fluorescência da mancha-amostra com a fluorescência da mancha das alíquotas dos padrões aplicados (Patterson & Roberts, 1979).

Os limites de detecção do método para a quantificação das amostras foram: aflatoxinas - B₁: 3 µg/kg; B₂: 2 µg/kg; G₁: 3 µg/kg e G₂: 2 µg/kg, zearalenona: 527,04 µg/kg, ocratoxina A: 76,48 µg/kg, esterigmatocistina: 84,8 µg/kg.

Foi utilizada a metodologia de Scott apud AOAC (1997) para confirmar as aflatoxinas B₁ e G₁; para a confirmação de ocratoxina A e zearalenona foi aplicada a metodologia de Golinski & Grabarkiewicz-Szczena apud AOAC (1997). A confirmação da esterigmatocistina seguiu a metodologia oficial descrita no item 973.38 da AOAC (1997).

Utilizaram-se extratos de grãos de milho nas análises das micotoxinas pelo método de cromatografia de camada delgada (CCD), empregando cromatofolhas de alumínio com camada de silicagel 60, 20 x 20.

Utilizaram-se os padrões de aflatoxinas B₁ (A 6636), B₂ (A9026), G₁ (A0138), G₂ (A9151); ocratoxina A (O1877); esterigmatocistina (S3255) e Zearalenona (Z2126).

As soluções padrões de trabalho de aflatoxinas foram: [B₁ (0,5g/g)]; [B₂ 0,1(g/g)]; [G₁ (0,5 g/g)] e [G₂ 0,1g/g], ocratoxina A [4,79g/g], zearalenona [54,9(g/g)] e esterigmatocistina [5,3(g/g)].

Os reagentes usados nas análises foram p.a..

8.2.14 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi completamente casualizado (DCC), com dois tratamentos e quatro repetições de cada unidade experimental constituída para as avaliações e determinações realizadas.

Os resultados de incidência de GA e de fungos patogênicos, do percentual de grãos com IMV e GN foram comparados entre o início e o final do período de armazenamento pelo teste T a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa computacional Statistica versão 5.0.

8.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O grau de umidade estabelecida pelos armazenistas dos silos Lodi e Cotrel, de 14,0 a 15,0%, para a conservação do milho armazenado, associada ao período de armazenamento, possibilitou avaliar a qualidade da conservação dos grãos através dos valores das médias das características investigadas. O período de armazenamento não influenciou na incidência de GA e de com grãos com IMV, que se manteve estável (Tabela 1).

O percentual de GN, evidenciou a excelente conservação dos grãos. A média final foi de 81,53% para o silo 5 e de 82,10% no silo 3. Lima & Bellaver (2000) observaram que a qualidade organoléptica dos grãos está relacionada a boas práticas de manejo e não apenas às características genéticas. Considerando que os grãos normais representem a qualidade do milho, constatou-se que os danos na produção podem alcançar valores próximos de 20,0% em decorrência das práticas culturais, das operações de colheita e de manejos na pós-colheita. Esses grãos com IMV e GA podem representar prejuízos para as características nutritivas e para a conservação da quantidade do produto.

Independentemente do grau de umidade os grãos armazenados nos silos 3 e 5 não apresentaram variação significativa a 5% de probabilidade nas variáveis IMV, GA + IMV e GN (Tabela 1). Os resultados das médias sugerem que a secagem e o armazenamento mantiveram a integridade dos grãos, visto que, de acordo com Puzzi (1989) e Lazzari (1997), o controle da temperatura de secagem é fundamental para evitar trincas no pericarpo que tornam os grãos armazenados suscetíveis à quebras e à infecção, afetando, por consequência, o valor comercial e nutricional do produto.

A soma de GA + IMV alcançou a média final de 18,63% no silo 3 e de 17,96% no silo 5. Esses valores classificaram o milho como de tipo 2, conforme a resolução n. 103 do Concex de 1975, utilizada na comercialização do cereal. Portanto, isso pode ser um alerta para os produtores, operadores de colhedoras, armazenistas, industriais e consumidores.

Um aspecto do manejo de armazenamento que pode ter influenciado na variação dos resultados, embora não significativo, foi a limpeza realizada antes da expedição dos grãos visando remover a poeira, as impurezas remanescentes e os fragmentos de grãos. A remoção das impurezas visou atender às exigências de consumidores, de produtores de rações e de processadores.

Tabela 1. Efeito do armazenamento sobre incidência de grãos ardidos (GA) e a percentagem de grãos com injúria mecânica visível (IMV) e de grãos normais (GN) em milho durante cinco meses no Silo 3 da Cotrel¹ e seis meses no silo 5 de Lodi². Safra 99/00.

Grãos de milho	Média inicial % ¹	Média final % ¹	t	Média inicial % ²	Média final % ²	t
GA	3,70	3,22	3,77	3,81 ¹	3,40 ¹	2,57
IMV	14,62	14,78	-0,51	14,68	15,26	-1,69
GA + IMV	18,30	17,96	1,24	17,94	18,63	-1,04
GN	81,71	82,06	1,33	82,15	81,53	0,90

t - teste t a 5% de probabilidade.

As infecções e as colonizações fúngicas dos grãos no período pós-colheita podem ser relacionadas aos grãos infectados na lavoura e à presença de inóculo misturado à massa de grãos à umidade dos grãos propícia para a germinação e o crescimento dos fungos.

O teor de umidade dos grãos entre 14,0 e 15,0% e a presença de GA e de grãos com IMV podem ter contribuído para que tenha ocorrido a variação significativa de incidência das espécies de *Aspergillus* spp. (Tabela 2) nos dois experimentos, visto que, de acordo com Puzzi (1989), os grãos trincados, com tegumento danificado ou grãos partidos são mais suscetíveis à ação dos fungos de depósito do que os grãos inteiros. Lazzari (1997) enfatiza que, se esses grãos e

fragmentos estiverem contaminados por micotoxinas, podem representar riscos à saúde dos animais que os consumirem. Neste trabalho, esses fatores não afetaram as características nutritivas dos grãos (Tabela 3).

Os fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Diplodia*, *Fusarium*, *Nigrospora* e *Penicillium* apresentaram maior incidência nos grãos, o que foi detectado nos grãos no início e ao final das avaliações (Tabela 2).

Os gêneros de fungos considerados de campo apresentaram redução significativa de incidência, durante o armazenamento. Essa resposta pode estar relacionada com a mudança do ambiente e durante as operações de colheita, de transporte dos grãos e de secagem, por causa das alterações de temperatura e do grau de umidade e, por último, pela formação de uma massa compacta de grãos que passaram a receber ar com a finalidade de uniformizar e baixar a temperatura e a umidade dos grãos no armazenamento.

As espécies de *Penicillium* spp. não tiveram variação significativa de incidência durante o armazenamento. Esses resultados podem ser atribuídos à influência do baixo grau de umidade dos grãos e à aeração. Porém, as espécies do gênero *Aspergillus* apresentaram aumento de incidência. Esse resultado sugere que o grau de umidade de armazenamento empregado pelos armazenistas e a aeração não foram seguros para as espécies *Aspergillus* spp., embora não tenham sido detectadas micotoxinas (Tabela 3).

TABELA 2. Efeito do armazenamento na incidência de fungos em grãos de milho em milho durante cinco meses no Silo 3 da Cotrel¹ e seis meses no silo 5 de Lodi². Safra 99/00.

Fungos	Média	Média	t	Média	Média	t
--------	-------	-------	---	-------	-------	---

patogênicos	inicial % ¹	final % ¹		inicial % ²	final % ²	
<i>Fusarium moniliforme</i>	20,62	12,40	12,83	17,20	12,49	12,18
<i>F. graminearum</i>	1,05	0,00	27,30	1,30	0,00	27,70
<i>Cephalosporium</i> spp.	28,91	15,61	23,75	27,33	13,40	33,91
<i>Aspergillus</i> spp.	2,63	4,88	-15,74	2,85	4,13	-15,20
<i>Penicillium</i> spp.	7,48	8,10	-2,55	7,83	8,36	-3,02
<i>Diplodia</i> spp.	0,85	0,17	13,42	1,08	0,17	21,32
<i>Nigrospora</i> spp.	5,25	1,58	30,97	5,07	1,14	31,96

t - teste t a 5% de probabilidade.

Na Tabela 3, verifica-se que o PH independentemente do local, não apresentou variação significativa entre o início e o final do armazenamento. Isso, pode estar associado à uniformidade da massa de grãos e a limpezas realizadas. Os valores de PH do milho envolvido nos experimentos dos silos 3 e 5 indicam uma massa granular uniforme, com reduzido percentual de grãos chochos e atacados por insetos.

A análise bromatológica revelou que as condições de armazenamento dos grãos empregadas foram adequadas e permitiram a conservação das características nutricionais e químicas do milho, apesar do aumento da incidência de fungos *Aspergillus* (Tabela 2).

Os resultados indicam que as condições de armazenamento empregadas nos silos Cotrel e Lodi são recomendadas para grãos de milho para o período investigado, visto que os fungos não interferiram na qualidade nutricional dos grãos.

O período de armazenamento de até seis meses foi curto, considerando que a necessidade de estocagem para o consumo na entressafra se estende até o início da safra agrícola do ano seguinte. Os primeiros meses após a colheita, na região Sul do Brasil, ocorrem as estações em que as temperaturas se mantêm baixas e favorecem o

armazenamento, mesmo com o teor de umidade dos grãos entre 14,0 - 15,0%.

Para reduzir e controlar as reações que originam a perda de matéria seca foram usadas 862 horas de aeração no silo 3 da Cotrel e 304 horas no silo 5 de Lodi. No silo 5 de Lodi, a aeração foi acionada com maior frequência nas noites frias do inverno, nos meses de julho e agosto, procedimento que permitiu manter a temperatura da massa dos grãos em níveis próximos de 0 °C. Essa condição permitiu manter a temperatura baixa e estável durante os meses da primavera. Dessa forma, essas operações do armazenista podem ter influenciado na conservação da qualidade nutritiva dos grãos e na redução do uso da aeração, visto que no silo 3 foi usado um número superior de horas de aeração.

Foram realizadas análises de detecção de micotoxinas no início e no fim do armazenamento. As avaliações mostraram que apesar da elevação da incidência dos fungos *Aspergillus* spp. não produziram micotoxinas. Os fungos pela ação danosa que podem causar ao produto no campo e no armazém, merecem a atenção constante de produtores, operadores de colhedoras, armazenistas e armazeneiros.

TABELA 3. Efeito das condições de armazenamento na conservação da qualidade nutritiva da matéria seca dos grãos durante cinco meses no Silo 3 da Cotrel e de seis meses no silo 5 de Lodi Safra 99/00.

Características químicas	Média inicial % ¹	Média final % ¹	t	Média inicial % ²	Média final % ²	t
Peso Hectolitro PH	73,77	75,11	-2,98	74,40	75,49	-2,12
Proteína Bruta	10,26	10,25	0,05	10,26	10,12	0,91
Lipídios	4,53	4,39	1,69	4,61	4,65	-0,37
Carboidratos	83,44	83,79	-0,89	83,46	83,44	0,06
Energia Líquida Lactação	2,05	2,04	0,65	2,04	2,05	-1,00

Energia Líquida Ganho	1,55	1,54	1,73	1,55	1,55	-0,52
Nutrientes Digestíveis Totais	88,19	87,60	2,24	88,23	88,26	-0,22
Energia Metabolizável	415,58	415,64	-0,11	416,38	416,34	0,06
En. Líquida Manutenção	2,27	2,27	-0,52	2,27	2,10	0,98
Fibra Bruta	0,58	0,49	1,81	0,50	0,54	-1,30
Fibra Detergente Ácido	5,80	5,56	0,90	5,80	5,75	0,36
Fibra Detergente Neutro	10,99	10,30	0,62	10,72	10,61	0,86
Massa Seca	87,14	87,10	0,91	87,14	87,10	0,91
Cinzas	1,14	1,26	-1,12	1,28	1,16	1,03
Fósforo (P)	0,24	0,24	-	0,24	0,24	-
Potássio (K)	0,35	0,35	-	0,35	0,35	-
Magnésio (Mg)	0,09	0,09	-	0,09	0,09	-
Cálcio (Ca)	0,05	0,05	-	0,05	0,05	-
Aflatoxinas	-	-	-	-	-	-
Ocratoxina A	-	-	-	-	-	-
Zearalenona	-	-	-	-	-	-
Esterigmatocistina	-	-	-	-	-	-

t - teste t a 5% de probabilidade.

8.4. CONCLUSÃO

O armazenamento de grãos propiciou condições adequadas para a conservação das propriedades nutritivas do milho, nos dois locais avaliados, porém houve elevação da incidência das espécies de fungos do gênero *Aspergillus*.

9. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados de pesquisa desenvolvida com o objetivo de caracterizar os fatores envolvidos na ocorrência de fungos de pré e pós colheita e na qualidade de grãos de milho possibilitaram as seguintes conclusões:

1 a ocorrência de fungos patogênicos e a contaminação por micotoxinas em grãos de milho durante sua permanência na lavoura foram influenciadas pelo retardamento da colheita.

2. A incidência de grãos ardidos e de *Fusarium moniliforme* foi relacionada com a perda de água dos grãos maduros.

3. O manejo de colheita afetou a qualidade comercial dos grãos de milho produzidos nas lavouras das regiões do Planalto Médio e Alto Uruguai do estado do Rio Grande do Sul.

4. O grau de umidade dos grãos entre 14,0% e 15,0% associado ao manejo de armazenamento propiciaram condições adequadas para a conservação das propriedades nutritivas do milho, porém possibilitou a elevação da incidência das espécies do fungo do gênero *Aspergillus*.

5. O milho deve ser colhido tão logo o grau de umidade dos grãos possibilite que a operação de colheita seja realizada com o mínimo de danos nos grãos. A redução dos danos por injúria mecânica podem ser

minimizados pela regulagem adequada da colhedora, levando-se em consideração principalmente o grau de umidade dos grãos. A antecipação da colheita de milho reduz o inóculo dos fungos de armazenamento e a possibilidade de contaminação por micotoxinas.

6. O retardamento da colheita determinou o aparecimento de micotoxinas, de fungos de pré e pós colheita, as quais ao serem ingeridas são tóxicas, cancerígenas e afetam gravemente as funções vitais de animais domésticos e humanos, além de reduzirem a renda dos produtores rurais e o rendimento no processamento dos grãos. Prejudicam o desempenho dos animais domésticos elevando os custos de produção e abate. Geram encarecimento da saúde pública.

7. A redução do inóculo pela antecipação da colheita e pela limpeza periódica dos silos favorece a conservação da qualidade dos grãos de milho armazenados.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, V.K.; SINCLAIR, J.B. **Principles of seed pathology**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1997. 539p. Cap. 1: Introduction.
- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 4.ed. San Diego: Academic Press, 1997. 635p. Glossary.
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W. **Introductory mycology**. 3.ed. New York: J. Wiley & Sons, 1979. 646p.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **J. Off. Met. of Anal. of the Chem.** 16 th ed. Arlington: Patricia Cunniff, 1997. v. I e v II.
- ASEVEDO, I.G.; GAMBALE,, W; CORRÊA, B.; PAULA, C.R.; ALMEIDA, R.M.A.; SOUZA, V.M. Mycoflora and aflotoxigenic species of *Aspergillus* spp. isolated from stored maize. **Rev. Microbiologia**, São Paulo, v. 25, n.1, p. 46-50, 1994.
- BAKKER-ARKEMA, F.W. High-temperature grain drying. In: FAO TECHNICAL SYMPOSIUM ON GRAIN DRYING AND STORAGE IN LATIN AMERICA, 1993, Porto Alegre. **Paper n. III-01...**, Porto Alegre, 1993. p.13.
- BARTOV, I.; PASTER, N.; LISKER, N. The nutritional value of moldy grains for broiler chicks. **Poultry Science**, Champaign, v.61, p.2247-2254, 1982.
- BENNETT, J.W. Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and mycopathologia. **Mycopathologia**, The Hague, v.100, p.3-5, 1987.
- BENSCH, M.J. *Stenocarpella maydis* (Berk.) Sutton. Colonization of maize ears. **J. of Phytopathology**, Saint Paul, v.143, p.597-599, 1995.
- BENSCH, M.J.; VAN STADEN, J. RIJKENBERG, F. G. time and site of inoculation of maize for optimum infection of ears by *Stenocarpella maydis*. **J. of Phytopathology**, Saint Paul, v.136, p.265-269, 1992.
- BERGAMIN FILHO, A. Avaliação de danos e perdas. In: BERGAMIN, FILHO, A; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Eds.) **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Ceres, 1995. v. 1, p. 672-690.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. Importância das doenças de plantas. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.) **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3.ed. São Paulo: Ceres, 1995. v.1, p.717-727.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.) **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3.ed. São Paulo: Ceres, 1995. v.1, p.717-727.

BEZUIDENHOUT, G.C.; GELDERBLOM, W.C.A.; GORST-ALLMAN, C.P.; HORAK, R.M.; MARASAS, W.F.O.; SPITELLER, G.; VLEGGAR, R. Structure elucidation of fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **J. Chem. Soc. Chem. Commun.**, Washington, v.11, p.743-745, 1988.

BRADY, B.L. **Acremonium kiliense**. Key: Commonwealth Mycological Institute. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria n° 741, 1983.

BRANDALIZZE, V. Milho no contexto mundial. In: BORGES, G.; BORGES, L.D (Org.) SEMINÁRIO SOBRE TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DE MILHO, 2000, Passo Fundo. **Artigos...** Passo Fundo: Aldeia Norte, 2000. p. 127-135.

BRASIL. Portaria n. 11 de 12 de abril de 1996. Estabelece critérios complementares para a classificação do milho. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 72, p. 6231, 15 de abril de 1996. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Defesa Vegetal. Coordenação de Laboratório vegetal. **Regras para a análise de sementes**. Brasília: CLAV, 1992. 365p. Cap. 9: Teste de sanidade de sementes.

BROOKER, D.B.; BAKKER-ARKEMA, F.W.; HALL, C.W. **Drying and storage of grains and oil seeds**. New York: Von Nostrand Reinhold, 1992. 450p.

CAMARGO, L. E. A.; BERGAMIN FILHO, A. Controle genético. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.) **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3.ed. São Paulo: Ceres, 1995. v.1, p.729-758

CASA, R.T.; REIS, E.M.; ZAMBORLIM, L. Fungos associados à sementes de milho produzida nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 3, p.370-373, 1998.

CAWOOD, M.E.; GELDERBLOM, W.C.A; VLEGGAR, R.; BEHREND, Y.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O. Isolation of fumonisin mycotoxins: A quantitative approach. **J. Agric. Food. Chem.**, Washington, v.39, p 1958-1962, 1991.

CHRISTENSEN, C.M. Moisture content, moisture transfer, and invasion of stored sorghum seeds by fungi. **Phytopathology**, Saint Paul, v.60, p.280-283, 1970.

CHRISTENSEN, C.M. Needed: Research on storage molds in grain, seeds, and their products. **Plant Disease**, Saint Paul, v.64, p.1067-1070, 1980.

CHRISTENSEN, C.M.; KAUFMANN, H.H. Microflora. In: CHRISTENSEN, C. H. (Ed.) Storage of cereal grains and their products. **Am. Assoc. of Cereal Chem.**, Saint Paul, v.7, p.145-150, 1974.

CHRISTENSEN, C.M.; MERONUCK, R.A. **Quality maintenance instored grains and seeds**. Minneapolis: University of Minnesota Press, 1986. 138p.

CIEGLER, A. Trichothecenes: Occurrence and toxicoses. **J. of Food Protection**, Ames, v.41, n.5, p.399-403, 1978.

CONCEX - **Conselho Nacional de Comércio Exterior** - Diversas Resoluções - Resolução 103 de 21.10.1975, 1975.

COTTEN, T.K.; MUNKVOLD, G.P. Survival of *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans* in maize stalk residue. **Phytopathology**, Saint Paul, v.88, p. 550-555, 1998.

COULOMBE, R.J.Jr. Biological action of mycotoxins. **J. of Dairy Science**, Lancaster, v.76, n.3, p.880-891, 1993.

CRUZ, L. C. H. da Características gerais das micotoxinas e micotoxicoses, reflexos na indústria avícola. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE MICOTOXINAS E MICOTOXICOSES EM AVES, 1995, Curitiba. **Anais...** Curitiba, [s.n], 1995. p.01-13.

CRUZ, J.O milho que o Brasil planta. **Cultivar**, Pelotas, v. 2, n. 19, p. 42-46. 2000.

DEL RIO, L.; MELARA, W. Dispersion de *Stenocarpella maydis* (Berk.) Sutton en un cultivo de maiz, **Ceiba**, Camayagua, v.32, p.133-140, 1991.

DICKSON, J. G. **Diseases of field crops**. New York: McGraw Hill, 1957. 517 p.

DHINGRA, O.D.; COELHO NETO, R.A. Micotoxinas em grãos. **RAPP**, Viçosa, v.06, p.49-68, 1998.

DOKO, M.B.; VISCONTI, A. Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in corn and corn-based human foodstuffs in Italy. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 11, p.433-439, 1994.

DOLL, R.; PETO, R. The causes of cancer: quantitative estimates of available risks of cancer in the United States today. **J. Natl. Cancer Institute**, [s.l.], v.66, p.1191-1308, 1981.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press, v.1, 1980. 859p.

DOURADO NETO, D.; FANCELLI, A.L. **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 360p. Cap. 1; Cap. 3; Cap. 7 e Cap. 10.

DOWSWELL, C.R.; PALIWAL, R.L.; CANTRELL, R.P. **Maize in the third world**. Oxford: Westview Press, 1996. 244p.

EICHELBERGER, L. **Secagem e armazenamento de grãos**: manual de treinamento. Porto Alegre: SENAR/AR-RS, 2000. 72p.

EUGENIO, C.P.; CHRISTENSEN, C.M.; MIROCHA, C.J. Factors affecting production of the mycotoxin F-2 by *Fusarium roseum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.60, p.1055-1057, 1970.

FANCELLI, A.L. Fisiologia da produção e aspectos básicos de manejo para o lato rendimento. In: BORGES, G.; BORGES, L. D. (Org.) SEMINÁRIO SOBRE TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DE MILHO, 2000, Passo Fundo. **Artigos...** Passo Fundo: Aldeia Norte, 2000. p.101-106.

FANCELLI, A.L. Pré-processamento. In: FANCELLI, L. A.; LIMA, U.A. (Eds.) **Milho**: produção, pré-processamento e transformação agroindustrial. São Paulo: Secretaria d Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, 1982. 112p. (Extensão Agroindustrial, 5).

FLETT, B.C.; McLAREN, N.W. Optimum disease potencial for evaluating resistance to *Stenocarpella maydis* ear rot in corn hybrids. **Plant Disease**, Saint Paul, v.78, p.587-589, 1994.

FLETT, B.; WEHNER, F. C. Incidence of *Stenocarpella* and *Fusarium* cob rots in monoculture maize under different tillage systems. **J. of Phytopathology**, Saint Paul, v.133, p.327-333, 1991.

FLETT, B.; WEHNER, F. C. SMITH, M. F. Relationship between maize stubble placement in soil and survival of *Stenocarpella maydis* (*Diplodia maydis*). **J. of Phytopathology**, Saint Paul, v.134, p.33-38, 1992.

FLOSS, E.L. Manejo de coberturas: aspectos físicos e químicos visando alta produtividade em milho. In: BORGES, G.; BORGES, L. D. (Org.) SEMINÁRIO SOBRE TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DO MILHO, 2000, Passo Fundo. **Artigos...** Passo Fundo: Aldeia Norte, 2000. p.39-51.

FOLEY, D.C. Systemic infection of corn by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.52, p.870-872, 1962.

FONSECA, H. Fatores que influencia na ocorrência de micotoxinas em milho. In: MOLIN, R.; VALENTINI, M. L.(Org.) SIMPÓSIO SOBRE MICOTOXINAS EM GRÃOS, 1999, Ponta Grossa. **Artigos...** São Paulo: Fundação Cargill/Fundação ABC, 1999. p.9-20.

FONSECA, H. Sistema de amostragem para análise de aflatoxinas em grãos. **Rev. Microbiologia**, São Paulo, v. 21, p.66, 1991.

FURLONG, E. B. **Tricotecenos em trigo: Um estudo de metodologia analítica, incidência, contaminação simultânea por outras micotoxinas e de alguns fatores que influem na produção no campo.** Campinas, 1995. 120f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas, 1995.

GELDERBLOM, W.C.A.; JASKIEWIEZ, K.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; HORAK, R.M. VLEGGAR, R.; KRIEK, N.P.J. Fumonisin: novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Baltimore, v. 54, p. 1806-1811, 1988.

GOERING, J. K.; VAN SOEST, P.J. **Forage fiber analysis apparatus, reagents, procedures, and some applications.** Washington: Agric. Handbook, 1970. 379p.

GOLINSKI, P.; GRABARKIEWICZ-SZCZENA, J. Chemical confirmatory tests for ochratoxin A, citrinin, penicilic acid, sterigmatocystin, and zearalenone performed directly on thin layer chromatographic plates. **J. of the Assoc. of Off. Anal. Chem.**, Arlington, v. 67, n.6, p.1108-1110, 1984.

GOURAMA, N.; BULLERMAN, L.B. *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*: Aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: a review. **J. of Food Protection**, Ames, v.58, n.12, p.1395-1404, 1995.

GUNASEKARAN, S.; DESHPANDE, S.S.; PAULSEN, M.R.; SHOVE, G.C. Size characterization of stress cracks in corn kernels. **Transactions of the ASAE**,[s.l.], v. 28, n.5, p.1668-1672, 1985.

HALD, B. Human exposure to ochratoxin A. In: MYCOTOXINS AND PHICOTOXINS'1988, 1988, Amsterdam. **Proceedings....**Amsterdam: Elsevier, 1989. p. 57-68. (Bioactive molecules, 10).

HAYES, A.W. **Mycotoxin teratogenicity and mutagenicity.** Boca Raton: CRC Press, 1981. Cap. 2, p.11-40

HEADRICK, J.M.; PATAKY, J.K. Maternal influence on the resistance of sweet corn lines to kernel infection by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.81, p.268-274, 1991.

HEATHCOTE, J.C. **Aflatoxins and related toxins**. In: BETINA, V. (Ed.) *Micotoxins: production, isolation, separation and purification*. Amsterdam: Elsevier, 1984. p. 89-130.

HEINZMANN, F.X. Resíduos culturais de inverno e assimilação de nitrogênio por culturas de verão. **Pesquisa Agrop. Bras.**, Brasília, v. 20, p.1021-1030, 1985.

HESELTIME, C.W.; BOTHAST, R.J. Mold development in ear of corn from tasseling to harvest. **Mycologia**, New York, v.69, p.328-340, 1977.

HESELTIME, C.W.; SORENSON, W.G.; SMITH, M. Taxonomic studies of the aflatoxin-producing strains in the *Aspergillus flavus* group. **Mycologia**, New York, v.62, p.123-132, 1970.

HOERNISCH, R.W.; DAVIS, R.M. Relationship between kernel pericarp thickness and susceptibility to *Fusarium* ear rot in field corn. **Plant Disease**, Saint Paul, v.78, p.517-519, 1994.

JIMÉNEZ, M.; MÁÑEZ, M.; HERNÁNDEZ, E. Influence of water activity and temperature on the production of zearalenone in corn by three *Fusarium* species. **Intern. J. of Food Microb.**, Oxford, v.29, p.417 - 421, 1996.

JOFFE, A.Z. ***Fusarium* species their biology and toxicology**, New York: J. Wiley & Sons, 1986. 588p.

KEDERA, C.J.; LESLIE, J.F.; CLAFLIN, L.E. Systemic infection of corn by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.82, p.1138, 1992.

KIMATI, H.; BERGAMIN FILHO, A. Princípios gerais de controle. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.) **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3.ed. São Paulo: Ceres, 1995. v.1, p. 692-709.

KING, S.B. Time of infection of maize kernels by *Fusarium moniliforme* and *Cephalosporium acremonium*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.71, p.796-799, 1981

KLAPPROTH, J.C.; HAWK, J.A. Evaluation of four inoculation techniques for infecting corn ears with *Stenocarpella maydis*. **Plant Disease**, Saint Paul, v.75, p.1057-1060, 1991.

KOEHLER, B.; BOEWE, G.H. Causes of corn stalk in Illinois. **Plant Disease**, Saint Paul, v.41, p.501-504, 1957.

KOEHLER, B. Natural mode of entrance of fungi into ears and some symptoms that indicate infection. **Plant Disease**, Saint Paul, v.73, p.887-892, 1942.

KOMMEDAHL, T; WINDELS, C.E. Root-, stalk-, and ear- infecting *Fusarium* species on corn in the USA. In: NELSON, P.E.; TOUSSON, T.A.; COOK R.J (Org.). *Fusarium: diseases, biology, and taxonomy*. Pennsylvania: University Park, 1981. p.94-103.

KOSOSKI, A.R. Dois métodos comparando a obtenção do equilíbrio higroscópico dos grãos. **Rev. Bras. de Armazenagem**, Viçosa, v.2, n.2, p. 31-34, 1977.

KUIPER-GOODMAN, T. Risk assessment of ochratoxin A: na update. **Food Ad. and Contaminants**, London, v.13, p.53-57, 1996. (suplement).

LAZZARI, F.A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 2 ed. Curitiba: [s.n.], 1977.133p.

LILLEHOJ, E.B.; ZUBER, M.S. Distribution of toxin-producing fungi in mature maize kernels for diverse enviromenmts. **Trop. Science**, México, v.28, p.19-24, 1988.

KROGH, P. Ochratoxins. In: RORICIS, J.V.; HESSELTINE, C.W.; MEHLMAN, M.A. (Eds.) **Mycotoxins in human and animal health**. Park Forest South: Pathotox Publ., 1977. p.489-498.

LAZZARI, F.A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 2 ed. Curitiba: [s.n.], 1977.133p.

LIMA, G.J.M.M. de; BELLAVAR, C. Milho de qualidade superior na alimentação de suínos e aves. In: SEMINÁRIO SOBRE TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DO MILHO, 2000, Passo Fundo. **Artigos...** Passo Fundo: Aldeia Norte, 2000. p.86-100.

LÓPEZ, J.; PADILLA, R.; SALVATIERRA, E. OCAMPO, R.; COLINDRES, A.; PINEDA, L. BUSTAMANTE, M.; MONTERROSO, D. Estimación delas pierdas provocadas por la podrición de la mazorca de maiz em Taulabe. **Ceiba**, Camayagua, v.31, p.11-14, 1990.

LUTEY, R.W.; CHRISTENSEN, C.M. Influence of moisture content, temperature, and lengh of storage upon survival of fungi in barley kernel. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 53, p. 713-717, 1963.

LUZ, W.C. da **Diagnose e controle das doenças da espiga de milho no Brasil**. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1995. 28p., (Circular Técnica, 5).

LYE, M.S.; GHAZALI, A.A.; MOHAN, J.; ALWIN, N.; NAIR, R.C. Na ourbreak of acute hepatic encephalopathy due to severe aflatoxicosis in Malasia. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v.53, p.68-72, 1995.

MACHADO, J. A. Melhoramento genético de cereais visando micotoxinas. In: MOLIN, R.; VALENTINI, M. L. (Org.) SIMPÓSIO

SOBRE MICOTOXINAS EM GRÃOS, 1999, Ponta Grossa. **Artigos...**, São Paulo: Fundação Cargill/Fundação ABC, 1999. p. 41-55.

MALLOZZI, M.A.B.; CORRÊA, B. **Fungos toxigênicos e micotoxinas.**, São Paulo: USP, 1998. 29p. (Boletim técnico, 12).

MANNS, T.F.; ADAMS, J.F. Parasitic fungi of seed corn. **J. Agric. Research**, Washington, v.23, p.495-524, 1923.

MANTOVANI, E.C. **Colheita mecânica, secagem e armazenamento do milho.** São Paulo: Fundação Cargill, 1989. Cap. 01, p. 01-24.

MANTOVANI, B.H.M.; FONTES, R.A. **Colheita mecânica, secagem e armazenamento do milho.** São Paulo: Fundação Cargill, 1989. Cap. 02, p.25-35.

MARASAS, W.F.O. Fumonisin: their implications for human and animal health. **Natural Toxins**, London, v.3, n.4, p.193-198, 1995.

MARASAS, W.F.O. Diplodiose in catle. In: WILLIE, T.D.; MOREHOUSE, L.G. (Eds.) **Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicosis.** An encyclopedic handbook. New York: Mercel Decker, 1978. V. II, p. 163-165.

MARASAS, W.F.O. The Genus *Diplodia*. In: WILLIE, T.D. & MOREHOUSE, L.G. (Eds.) **Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicosis.** An encyclopedic handbook. New York: Mercel Decker, 1977. V.I, p.119-128.

MARASAS, W.F.O.; KRIEK, N.P.J. WIGGINS, V.M. STEYN, P.S.; TOWERS, D.K.; HASTIE, T.J. Incidence, geographical distribution and toxigenicity of *Fusarium* species in South African corn. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, p. 1181-1195, 1979.

MARASAS, W.F.O. NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A. **Toxigenic *Fusarium* species.** Pennsylvania: University Park, 1984. 328p.

MARCHESAN, E.; COSTA, JA. Perdas na colheita de soja. **Lavoura Arrozeira**, Porto Alegre, nov/dez, ?, 1980.

MÁRCIA, B.A.; LAZZARI, F.A. Monitoramento de milho em grão, grits e fubá. **Ciência e tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.18, n.4, p.363-367, 1998.

MARSH, S.F.; PAYNE, G.A. Scanning electron microscopy of *Aspergillus flavus* of corn silks. **Phytopathology**, Saint Paul, v.71, p.893, 1981. (Abstr.).

MARQUARDT, R.R.; FROHLICH, A.A. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. **J. Animal Science**, Champaign, v.70, p.3968-3988, 1992.

McGEE, D.C. **Maize diseases: a reference source for seed technologists.** Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1988. 150p.

MENEZES, M.; OLIVEIRA, S.M. de **Fungos fitopatogênicos.** Pernambuco: Imprensa Universitária da UFRPE, 1993. 277p.

MERKLEY, J.W.; MAXWELL, R.J.; PHILIPS, J.G.; HUFF, W.E. Hepatic fatty acid profiles in aflatoxin-exposed broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v.66, p.59-67, 1987.

MILLER, J.D. Fungi and mycotoxins in grain: Implications for stored product research. **J. of Stor. Prod. Research**, [s.l.], v.31, n.1, p.1-16, 1995.

MILLS, J.T.; ABRAMSON, D. Production of sterigmatocystin by isolates of *Aspergillus versicolor* from western Canadian stored barley and rapessed/canola. **Can. J. Plant Pathology**, Ottawa, v.8, p.151, 1986.

MISLIVEC, P.B.; TUIITE, J. Species of *Penicillium* occurring in freshly harvested and in stored dent corn kernels. **Mycologia**, New York, v.62, p.7-74, 1970.

MOLIN, R. Ocorrência de micotoxinas em estágios fenológicos próximas da colheita de milho. In: MOLIN, R.; VALENTINI, M. L. (Org.). SIMPÓSIO SOBRE MICOTOXINAS EM GRÃOS, 1999, Ponta Grossa. **Artigos...** São Paulo: Fundação Cargill/Fundação ABC, 1999. p.57-80.

MOORE, D.S.; WHITE, J.S. & HARBIN, B.A. Infrared sample preparation and interpretation using a knowledge system. **Anal. Chim. Acta**, [s.l.], v. 294, p.85-94, 1994.

MORAES, M.L.B.de; REIS, A.V.dos; TOESCHER, C.F. MACHADO, A.L.T. **Máquinas para colheita e processamento dos grãos.** Pelotas: Universitária/UFPel, 1996. 150p.

MORENO-MARTINEZ, E.; CHRISTENSEN, C. M. Differences among lines and varieties of maize in susceptibility to damage by storage fungi. **Phytopathology**, Saint Paul, v.61, p.1498-1500, 1971.

MORENO, E.; ZAMORA, J. **Guia para evitar problemas causados por hongos en simillas y granos almacenados.** Ciudad de México: MSDAGVET, 1986. 135p.

MUNKVOLD, G.P.; CARLTON, W.M. Influence of inoculation method on systemic *Fusarium moniliforme* infection of maize plants grown from infected seeds. **Plant Disease**, Saint Paul, v.81, p.211-216, 1997.

MUNKVOLD, G.P.; DESJARDINS, A.E. Fumonisin in maize: Can we reduce their occurrence? **Plant Disease**, Saint Paul, v.81, p.556-565, 1997.

MUNKVOLD, G.P.; MCGEE, D.C.; CARLTON, W.M. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, p. 209-217, 1997.

NELSON, P.E. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. **Mycopathologia**, The Hague. v.117, p.29-36, 1993.

NELSON, P.E.; PLATTNER, R.D.; SHACKLEFORD, D.D.; DESJARDINS, A.E. Fumonins B₁ production of by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in section *Liseola* and by some related species. **Appl. Environ. Microbiol.**, Baltimore, v.58, p.984-989, 1992.

NIJS, M. de, ROMBOUTS, F.; NOTERMANS, S. *Fusarium* molds and their mycotoxins. **J. of food safety**, [s.l.], v.16. p. 15-58, 1996.

NOGUEIRA Jr., S.; NOGUEIRA, E.A.; TSUNECHIRO, A. **Considerações sobre a agroindústria do milho**. São Paulo: Instituto de Economia Agrícola, 1987. 18p. (IEA Relatório de Pesquisa, 27).

OMS - Organización Mundial da la Salud. **Critérios da Salud Ambiental, 11: Micotoxinas**, Ciudad de México: Ed. O.P.S., 1983. 131p.

OOKA, J.J.; KOMMEDAHL, T. Wind and rain dispersal of *Fusarium moniliforme* in corn fields. **Phytopathology**, Saint Paul, v.67, p.1233-11235, 1977.

OSBORNE, B.G. Mycotoxins and the cereal industry a review. **J. of Food Technology**, [s.l.], v.17, p.1-9, 1982.

PACHECO, A.C.; DIETRICH, R.C. Avaliação de grãos ardidos em 32 híbridos de milho em Campo Erê-SC. **Pesq. Agrop. Gaúcha**, Porto Alegre, v.3, p.153-155, 1997.

PADILLA, J.L.R.; OCAMPO, E.S.R.; PINEDA, A.C.L. Estimación de las pérdidas provocadas por la pudrición de la mazorca de maiz en Taulabe. **Ceiba**, Coamyagua, v.3, p.9-14, 1990.

PANDEY, C.H.; KNAPP, E.B. Variabilidade genética do milho e adaptação de diferentes condições de estresses. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ESTRESSE AMBIENTAL, 1992, Belo Horizonte. **Artigos...** Belo Horizonte, 1992. (Milho em Perspectiva, 1).

PANTALEÓN, F.I.G. SALINAS, R.J.; EGEA, J.S.; VILLAREJO, J.M.; CRESPO, F.L. **Mohos en los alimentos**. Cordoba: ACTA-A Tipografía Católica, 1988. 88p.

PAYNE, G.A. Epidemiology of Aflatoxin Formation by *A. flavus*. In: DIENER, U.L.; ASQUITH, R.L.; DICKENS, J.W. (org.). **Aflatoxin and Aspergillus flavus in corn**. Alabama: Craftmaster Printers, 1983.

PATTERSON, D.S.P.; ROBERTS, B.A. Mycotoxins in animal feedstuffs: sensitive thin layer chromatographic detection of aflatoxin, ochratoxin A, sterigmatocystin, zearalenone and T2 toxin. **J. of the Assoc. of Official Anal. Chem.**, Arlington, v. 62, n.6, p.1265,1979.

PEREIRA, O.A.P. **Situação atual de doenças da cultura do milho no Brasil e estratégias de controle**. In: Resistência genética de plantas a doenças. Piracicaba: Departamento de Genética da ESALQ/USP, 1995. p. 25-30.

PEREIRA, O.A.P. Doenças de milho. In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN, FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Eds.) **Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 1997. v.2, p.538-555.

PINAZZA, L.A. Perspectivas da cultura do milho e do sorgo no Brasil. In: BÜLL, L.T.; CANTARELLA, H. (Org.) **Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Potafos, 1993. Cap. 01.

PINTO, N.F.J. de A. **Patologia de sementes de milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 1998. 44p. (Circular Técnica, 18).

PINTO, N.F.J. de A. FERNANDES, F.T.; FERREIRA, A.S. Ocorrência da murcha de *Cephalosporium acremonium* em milho. **Fit. Brasileira**, Brasília, v.16, n.2, 1991. (Resumo).

PIONEER, Sementes. **Guia do produtor**. Santa Cruz do Sul: Pioneer, 1998. 48p.

PROGRAMA MULTIINSTITUCIONAL DE DIFUSÃO DE TECNOLOGIA EM MILHO NO RIO GRANDE DO SUL. **Recomendações técnicas para a cultura do milho no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: FEPAGRO: EMATER: FECOTRIGO, 1999. 144p. (Boletim Técnico, 6).

PUZZI, D. **Abastecimento de armazenagem de grãos**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1989. 604p.

RABIÈ, C.J.; KELLERMAN, T.S.; KRIEK, N.P.J.; VAN Der WESTHUIZEN, G.C.A.; de WET, P.T. Toxicity of *Diplodia maydis* in farm and laboratory animals. **Food Chem. Toxicity**, [s.l.], v.23, p.349-353, 1985.

REBELIN, W.E. **Mycotoxin fungi, mycotoxins, mycotoxicoses and encyclopedic handbook**. New York: Mercel Dekker, 1978. p. 28-35.

REID, L.M.; NICOL, R.W.; QUELLET, T.; SAVARD, M.; MILLER, J.D. YOUNG, J.C.; ATEWART, D.W.; SCHAAFSMA, A.W. Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* in maize ears: Disease progress, fungal biomass, and mycotoxin accumulation. **Phytopathology**, Saint Paul, v.89, p.1028-1037, 1999.

REIS, E.M.; CASA, R.T. Ciclos biológicos e epidemiologia: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Diplodia* e *Fusarium*. In: MOLIN, R.; VALENTINI, M.L. (Org.) SIMPÓSIO SOBRE MICOTOXINAS EM GRÃOS, 1999, Ponta Grossa. **Artigos...** São Paulo: Fundação Cargill/Fundação ABC, 1999. p.9-20.

REIS, E.M.; CASA, R.T. **Manual de identificação e controle de doenças de milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 1996. 80p.

REIS, E.M.; DENTI, E.A.; TRENTO, S.M.; CASA, R.T.; SEVERO, R. Método para quantificar danos no rendimento de grãos causados pelas podridões da base do colmo do milho. **Fit. Brasileira**, Brasília, v. 23, p.300, 1998. (Resumo).

REIS, E.M. FORCELINI, C.A. Controle cultural In: BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.) **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3.ed. São Paulo: Ceres, 1995. V. 1, p.710-716.

RICHARDSON, M.D.; BACON, C.W. Catabolism of 6-methoxy-benzoxazoline and 2-benzoxazoline by *Fusarium moniliforme*. **Mycologia**, New York, v.87, p.510-517, 1995.

RIET-CORREA, F.; MÉNDEZ, M.C.; SCHILD, A.L.; MEIRELES, M.C.A.; SCARSI, R.M. **Laboratório Regional de Diagnóstico: Doenças Diagnosticadas no ano de 1983**. Pelotas: Editora Universitária, 1984. p. 29-30.

SALGADO, I.M.; CARVALHO, P.C.T. Fungos toxigênicos associados a cereais. 1º levantamento de microflora associada a milho, trigo e arroz. **Rev. Microbiologia**, São Paulo, v.11, p.60-63, 1980.

SAMSON, R.A.; PITT, J.I. **Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification**. New York: Plenum Press, 1990.

SCHMIDT, F.R.; ESSER, K. Aflatoxins: medical, economic impact and prospects for control. **Process Biochemistry**, Rickmanworth, v.20, n.6, p.167-174, 1985.

SCOTT, P.M. Mycotoxins. **J. of the Assoc. of Off. Anal. Chem.**, Arlington, v.71, n.1, p.7076, 1988.

SCOTT, P.M. Mycotoxins general referee reports. **J. of the Assoc. of Off. Anal. Chem.**, Arlington, v.74, n.1, p.120-128, 1991.

SETTI, T. Industrialização do milho no Brasil. In: CONGRESSO NACIONAL DO MILHO E SORGO, 19., 1992, Porto Alegre. **Conferências...** Porto Alegre: SAA, 1992. p.176-182.

SHENK, J.S.; WESTERHAUS, M.O. Population definition, and calibration procedures for near infrared reflectance spectroscopy. **Crop Science**, Pensilvânia, v. 31, p.469-474, 1991.

SHERWOOD, R.F.; PEBERDY, J.F. Production of the mycotoxin, zearalenone, by *Fusarium graminearum* growing on stored grain in grain and storage at reduced temperatures. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Londres, v.25, p.1081-1087, 1974.

SHURTLEFF, M.C. **Compendium of corn diseases**. 2^a ed. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1980. 105p. Cap. 1: Infectious diseases of maize: fungal diseases.

SHURTLEFF, M.C. **Compendium of corn diseases**. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1992. 105p.

SMITH, D.R.; WHITE, D.G. **Corn and Corn improvement**. 3.ed. Madison: American Society Agronomy, 1988. 986p. Cap. 12: Disease of Corn.

SOARES, L.M.V. **Micotoxinas**: Um método para análise simultânea e incidência em alimentos comercializados na região de Campinas. Campinas, 1987, 88f. Tese (Doutorado), Unicamp, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1987.

STYER, R.C.; CANTLIFFE, D.J. Infection two endosperm mutants of sweet corn by *Fusarium moniliforme* and its effect on seedling vigor. **Pytopathology**, Saint Paul, v. 74, p. 189-194, 1989.

SNYDER, A.P. Qualitative, quantitative and technological aspects of the trichothecenes mycotoxins. **J. of Food Protection.**, Ames, v. 49, n. 7, p. 544-569, 1986.

STEYN, P.G.; WESSELS, P.L. HORZAPFEL, C.W. POTGIETER, D.JJ. LOUW, K.A. The isolation and structure of a toxic metabolite from *Diplodia maydis*. (Berk) Sacc. **Tetrahedron**, Londres, v.28, p.4775-4785, 1972.

STYER, R.C.; CANTLIFFE, D.J. Infection two endosperm mutants of sweet corn by *Fusarium moniliforme* and its effect on seedling vigor. **Pytopathology**, Saint Paul, v. 74, p. 189-194, 1989.

STOB, M.; BALDWIN, R.S.; TUIITE, J.; ANDREWS, F.N.; GILLETTE, G. Isolation of anabolic, uterethophic compound from corn infected with *Giberella zaeae*. **Nature**, London, v.196, p.1318, 1962.

TANAKA, M.A.; BALMER, E. Efeito da temperatura e dos microrganismos associados ao tombamento e germinação de sementes de milho (*Zea mays* L.). **Fit. Brasileira**, Brasília, v.5, n.1, p.878-93, 1980.

THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O.; SYDENHAM, E. W. SHEPHARD, G.S.; GELDERBLUM, W.C.A.; NIEUWENHUIS, J. J. Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. **Appl. Environ. Microbiol.**, Baltimore, v.57, p.1083-1093, 1991.

TRENTO, S. M. **Quantificação de danos causados por podridões de espiga e de grãos ardidos em milho, em diferentes sistemas de manejo de plantas.** Passo Fundo, 2000. 70f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2000.

UENO, Y. Trichothecene: Chemical, biological and toxicological aspects. In: UENO, Y. (Ed.). **Develop. in Food Sc.**, Tokyo: Elsevier, 1983. v. 4.

UENO, Y. Trichothecene as environmental toxicants. In: HODGSON, E. (Ed.). **Rev. in Environ. Toxicology.** Amsterdam: Elsevier, 1986. Cap. 2.

ULLSTRUP, A.J. Observations on two ephiphytotics of *Diplodia ear* rot of corn in Indiana. **Plant Disease**, Saint Paul, v.48, p.414-415, 1964.

VESENDER, R.F.; HORN, B.W. Sterigmatocystin in dairy cattle feed contaminated with *Aspergillus versicolor*. **Applied Environ. Microb.**, Baltimore, v. 49, p.234, 1985.

VIEIRA, S.L. Micotoxinas e produção de ovos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE MICOTOXINAS E MICOTOXICOSES EM AVES, 1995, Curitiba. **Anais...** Curitiba, 1995. p.21-33.

VOGEL. A.I. **Análise química quantitativa.** 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 712p.

WEBER, E.A. **Armazenagem agrícola.** 2. ed. Porto Alegre: Kepler Weber Industrial, 1998. 400p.

WETZEL, M.M.V.S. Fungos de armazenamento. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. (Ed.) **Patologia de Sementes.** Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 26-275.

WARREN, H.L.; KOMMEDAHL, T. Prevalence and pathogenicity to corn of *Fusarium* species from corn roots, rhizosphere, residues and soil. **Phytopathology**, Saint Paul, v.63, p.1288-1290, 1973.

WHITLOW, L.W.; HAGLER Jr. W.M. Mycotoxins in dairy cattle. In: MOLIN, R.; VALENTINI, M.L. (Org.) SIMPÓSIO SOBRE MICOTOXINAS EM GRÃOS, 1999, Ponta Grossa. **Artigos...** São Paulo: Fundação Cargill/Fundação ABC, 1999. p.151-181.

WICKLOW, D.T. Taxonomic features and ecological significance of sclerotia. In: DIENER, U.L.; ASQUITH, R.L.; DICKENS, J.W. (Org.).

Aflatoxin and *Aspergillus flavus* in corn. Alabama: Craftmaster Printers, 1983.

WICKLOW, D.T & DONAHUE, J.E. Sporogenic germination of sclerotia in *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. **Trns. Br. Mycol. Soc.**, Cambridge, v.83, p.299-304, 1984.

WICKLOW, D.T & HORN, B.W. *Aspergillus flavus* sclerotia from wound-inoculated preharvest corn. **Mycologia**, New York, v.76, p.503-505, 1984.

WICKLOW, D.T.; HORN, B.W.; SHOTWELL, O; HESSELTINE, C. & CALDWELL, R. Fungal interference with *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination of maize grown in a controlled environment. **Phytopathology**, Saint Paul, v.78, p.68-74, 1988.

WIDSTROM, N.W.; WILSON, D.M.; McMILLIAN, W. W. Differentiation of maize genotypes for aflatoxin concentration in developing kernels. **Crop Science**, Pensilvânia, v.26, p.935-937, 1986.